



# Les sucres et l'astringence : effet des polysaccharides présents dans le vin sur les interactions tanins-protéines

Benoit Faurie

## ► To cite this version:

Benoit Faurie. Les sucres et l'astringence : effet des polysaccharides présents dans le vin sur les interactions tanins-protéines. Autre. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0191 . tel-01176443

**HAL Id: tel-01176443**

**<https://theses.hal.science/tel-01176443>**

Submitted on 15 Jul 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ CHIMIE-PHYSIQUE

Par **Benoit FAURIE**

**LES SUCRES ET L'ASTRINGENCE : EFFET DES  
POLYSACCHARIDES PRÉSENTS DANS LE VIN SUR LES  
INTERACTIONS TANINS-PROTÉINES**

Sous la direction de : Isabelle PLANET et Erick J. DUFOURC

Soutenue le 05 novembre 2014

Membres du jury :

M. FOUQUET Eric  
Mme KRIMM Isabelle  
M. DE FREITAS, Victor  
Mme LANDON Céline  
Mme PLANET, Isabelle  
M. DUFOURC, Erick J  
M.CHARLIER Laurent

Professeur de l'Université de Bordeaux  
Chargé de recherches CNRS de Lyon  
Professeur de l'université de Porto (Portugal)  
Directrice de recherche CNRS d'Orléans  
Ingénieur de recherche CNRS de Bordeaux  
Directeur de recherche CNRS de Bordeaux  
Chargé d'études au service technique du CIVB

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse  
Invité



## **Titre :** Les sucres et l'astringence : effet des polysaccharides présents dans le vin sur les interactions tanins protéines

### **Résumé :**

Les tanins jouent un rôle clé dans les qualités organoleptiques du vin rouge. Ils sont à l'origine de l'Astringence, une sensation de sècheresse perçue en bouche lors de la dégustation. Cette sensation est la conséquence d'une interaction spécifique entre des tanins et des protéines salivaires, principalement les Protéines Riches en Prolines (PRPs). Une première partie de ce travail a consisté à étudier l'influence de divers sucres sur le processus d'auto-association des tanins ainsi que sur les interactions tanins-protéines. Le comportement colloïdal d'un tanin (l'Epigallocatechine Gallate – EGCG), ainsi que son interaction avec un peptide modèle IB9-14 représentatif des PRPs, ont été étudiés en présence de différents sucres simples et polysaccharides. Les paramètres de l'interaction ont été déterminés pour l'ensemble des systèmes, mettant en évidence l'existence d'une interaction entre EGCG et sucres dont l'affinité semble dépendre du degré de polymérisation du sucre. Cette interaction ne perturbe pas, dans les conditions expérimentales testées, l'association entre les tanins et le peptide. Une deuxième partie de ce travail correspond à la synthèse complète de la protéine IB9 incluant la séquence peptidique d'IB9-14, et à l'étude de son interaction avec deux procyanidines : l'EGCG et le dimère B3. Cette étude a permis d'observer et de confirmer une influence de la longueur de la chaîne peptidique sur les interactions avec les tanins.

**Mots clés :** Protéines salivaires, Protéines Riches en Proline, synthèse, tanins, sucres simples, polysaccharides, interaction, RMN

---

**Title:** Sugars and astringency: effect of wine polysaccharides on the interactions between tannins and proteins.

### **Abstract:**

Tannins play a key role in the organoleptic qualities of red wine. They are responsible for wine astringency, a dry, rough and puckering sensation perceived in the mouth while tasting. This sensation is the consequence of a specific interaction between tannins and saliva proteins, mainly Proline Rich Protein (PRPs). The first part of this work was to study the influence of various sugars on the self-association of tannins process as well as tannins - proteins interactions. The colloidal behavior of a tannin (the epigallocatechin gallate - EGCG), as well as its interaction with a representative peptide IB9-14 of PRPs was studied in the presence of various simple sugars and polysaccharides. The parameters of the interaction were determined for all systems, highlighting the existence of an interaction between EGCG and sugars whose affinity seems to depend on the sugar polymerization degree. This interaction does not interfere, under the experimental conditions tested, on the association between tannins and peptide. The second part of this work was to realize the full synthesis of the protein IB9 including the peptidic sequence of IB9-14, and to study its interaction with two procyanidins: EGCG and dimer B3. The results show and confirm the influence of the length of the peptide chain interactions with tannins.

**Keywords :** Salivary proteins, Proline Rich Proteins, synthesis, tannins, simple sugars, polysaccharides, interaction, NMR





# Productions scientifiques et techniques

## Communications à des colloques/congrès

- GERM Biarritz 2014, XXVème conference du Groupe d'Etude de Resonance Magnétique (Biarritz, France, 1-6 juin 2014)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Effet des sucres sur l'astringence : l'influence des sucres simples et des polysaccharides

- 16<sup>ème</sup> journée de l'école doctorale des Science Chimiques (Bordeaux, France, 17 avril 2014)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Sugar impact on astringency of simple surgars and polysaccharides

## Présentations par voie d'affiches

- GEM XV, XVème congrès du Groupe d'Etude des Membranes (Paris, France, 2-4 avril 2012)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Sugar impact on astringency

- XXVème ICMRBS, International Conférence on Magnétic Resonance in Biological Systems (Lyon, France 19-24 Aout 2012)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Sugar impact on astringency

- 15<sup>ème</sup> journée de l'école doctorale des Sciences Chimiques (Bordeaux, France, 25 avril 2013)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Sugar impact on astringency

- 8<sup>ème</sup> symposium In Vino Analytica Scientia 2013 (Reims, 2-5 juillet 2013)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Sugar impact on astringency

- CBMN Day 2013 (Bordeaux, France 3-4 octobre 2013)

**Faurie, B.**, Dufourc, E.J. and Pianet I.

Sugar impact on astringency



A ma mère,

mon père,

ma compagne,

et mes amis.



# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Victor De Freitas, Isabelle Krimm et Celine Landon pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que Eric Fouquet pour avoir présidé ce jury. Merci à vous tous pour vos corrections et vos conseils.

Je remercie le CIVB pour avoir financé cette thèse et plus particulièrement Monsieur Charlier pour ces nombreux conseils lors de nos différentes discussions.

Je remercie plus particulièrement mes deux directeurs de thèse Isabelle Pianet et Erick Dufourc pour m'avoir proposé ce sujet extrêmement passionnant et m'avoir accueillis au sein de leur laboratoire respectif. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance durant ces trois années et de m'avoir transmis vos connaissances de pointe en Résonance Magnétique Nucléaire. Je n'oublierai pas ces trois années passées au sein de vos deux laboratoires riches en rencontres à la fois scientifiques et personnelles.

Merci Isabelle pour votre accueil au CESAMO (au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires UMR 5255), et pour tous nos échanges scientifiques au cours de ces trois années, ainsi que pour vos conseils lors de la rédaction du manuscrit. Merci également de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès et écoles thématiques à la fois dans le domaine de la RMN et dans le domaine des polyphénols. Ces expériences m'ont permis d'enrichir mon expérience scientifique et mon aisance en communication.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des scientifiques de ce laboratoire et plus précisément Noel Pinaud et Jean Michel Lasnier pour leurs conseils en RMN ; ainsi que Christelle Absalon, Patricia Castel et Claire Mouche pour leur disponibilité pour réaliser toujours au plus vite les spectres de Masse dont j'avais besoin. Je n'oublie pas non plus Aline Lacoudre, Pierre Danial-Fortain et l'ensemble de l'équipe de chez Demptos. Merci à tous pour votre bonne humeur et les nombreux rires lors des pauses café.

Merci Eric pour votre accueil au sein du laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (CBMN, UMR 5248) ainsi que pour votre regard affuté et vos précieuses remarques lors de nos réunions. Celles-ci m'ont été d'une grande aide pour avancer dans ce projet de recherche. Merci également pour votre relecture attentive du manuscrit et vos conseils.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de cette équipe titulaire ou non, en ayant une pensée particulière pour mes collègues de Master, eux aussi en thèse au sein du CBMN : Denis Martinez, Alexis Mougeolle et Marie lise Jobin.

Une partie de ces travaux ayant été réalisée au sein de l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), je me permets de remercier les trois co-directeurs de cet institut, Messieurs Ivan Huc, Jean-Louis Mergny et Jean-Jacques Toulmé pour m'avoir permis d'utiliser leurs locaux.

Je remercie plus particulièrement l'équipe RMN de cette structure. Axel Grelard qui m'a beaucoup appris en étant toujours présente pour répondre à mes questions et me conseiller sur une séquence RMN, ainsi que tous les ingénieurs et techniciens présents et anciens que j'ai pu côtoyer : Estelle Morvan, Vanessa Zhendre, Cecile Loudet-Courrèges.

Je souhaite remercier vivement mes collaborateurs. Victor De Freitas pour son accueil à l'université de Porto (Portugal) et pour le transfert de ses connaissances et techniques de synthèse de procyanidines dimères. Claude Manigand pour ses précieuses heures passées avec moi sur la synthèse de la protéine complète.

Je remercie aussi profondément mes amis, ceux de l'Association des Doctorants en Chimie de Bordeaux (ADoC), mais aussi les plus proches.

Sébastien un ami de longue date (et oui il vaut mieux arrêter de compter maintenant). Merci pour ton soutien durant ces trois années et nos fameuses soirées « pizza vin » qui m'ont souvent permis de décompresser au bon moment. Merci d'être là depuis toutes ces années.

Nicolas et Olivier, anciens collègues, qui sont rapidement devenus de vrais amis. Je garderai toujours en mémoire nos longues soirées au laboratoire ou ailleurs qui ont toujours été riches en bonne humeur. J'en profite également pour remercier Alain Brisson qui m'a fait confiance en m'ouvrant les portes du laboratoire dès ma troisième année de licence et qui depuis m'a généreusement accompagné et conseillé en me transmettant sa passion pour la Science et la Recherche.

Un remerciement tout spécial également à toi Karine, pour m'avoir supporté au quotidien pendant cette dernière année de thèse et surtout au moment de la rédaction. Merci de m'avoir épaulé et toujours soutenu pendant cette dernière ligne droite.

Je finirai tout simplement par remercier mes parents, ceux grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, ceux qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et qui m'ont toujours épaulé. Merci pour les valeurs morales et le goût du travail que vous m'avez inculqués et merci pour cette belle famille que nous formons.

*« J'avais commandé un Figeac 71, mon Saint-Emilion préféré.  
Introuvable. Sublime. Rouge et doré comme peu de couchers de soleil.  
Profond comme un la mineur de contrebasse. Eclatant en orgasme au soleil.  
Plus long en bouche qu'un final de Verdi.  
Un vin si grand que Dieu existe à sa seule vue »*

*(Pierre Desproges)*





# LISTE DES ABREVIATIONS

**AG-II** : arabinogalactanes

**AGP** : arabinogalactane-protéines de type II

**Bn** : Benzyl

**Boc** : tert-Butoxycarbonyl

**BSA** : Albumine de Sérum de Bœuf

**CMC** : Concentration Micellaire Critique

**COSY** : Correlation SpectroscopY

**COSY-DQF** : COSY avec un filtrage double quanta

**C-term** : extension carboxy-terminale

**D<sub>2</sub>O** : eau deutéré

**DC** : Dichroïsme Circulaire

**DCC** : Dicyclocarbodiimide

**DCM** : Dichlorométhane

**DDQ** : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzophenone

**DIEA** : Diisopropylethylamine

**DLS** : Diffusion dynamiques de la lumière

**DMF** : N,N-diméthylformamide

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DOSY** : Diffusion Ordered SpectroscopY

**EDT** : Ethanedithiol

**EGCG** : Epigallocatechine-gallate

**EGC** : Epigallocatechine

**ESI** : ionisation par électronébulisation

**EtOD** : Ethanol deutéré

**FID** : Free Induction Decay

**Fmoc** : 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

**HBTU** : 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate

**HOBt** : 1-Hydroxybenzotriazole

**HRMAS** : High Resolution - Magic Angle Spinning

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Coherence

**J** : Constante de couplage (en Hertz)

**k** : Vitesse d'échange

**Kd** : Constante de dissociation

**k<sub>on</sub>** : Vitesse d'association

**k<sub>off</sub>** : Vitesse de dissociation

**Ka** : Constante d'auto-association

**MALDI-TOF** : Matrix assisted laser desorption/ionisation

**MP** : Mannoprotéines

**MM** : Modélisation moléculaire

**MeOH** : Méthanol

**NMP** : N-méthylpyrrolidone

**NOE** : Nuclear Overhauser Enhancement

**NOESY** : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

**N-ter** : extension amino-terminale

**Pbf** : 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PRAG** : Polysaccharides riches en arabinose et galactose

**PRP** : Protéine riche en proline

**RG** : Rhamnogalacturonanes

**R<sub>H</sub>** : Rayon hydrodynamique

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMSD** : Root mean squared deviation

**ROESY** : Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

**SDS-page** : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

**SPPS** : Synthèse de peptide en phase solide

**STD** : Différence de transfert de saturation

**TFA** : Acide trifluoroacétique

**TFE** : Trifluoroéthanol

**THF** : Tétrahydrofurane

**TIPS** : 6,13-bis(triisopropylsilylethynyl)

**TOCSY** : Total Correlation Spectroscopy

**TOF** : Time of flight (Temps de vol)

**Tp** : Tampon

**TSP** : Acide 3-trimethylsilyl-propionique-2,2,3,3-d4

**UV** : Ultra-violet



# CHAPITRE I : INTRODUCTION

<b>A-</b>	<b>LES COMPOSES DU VIN ET LA SENSATION D'ASTRINGENCE .....</b>	<b>2</b>
<b>B-</b>	<b>LES PROTEINES SALIVAIRES.....</b>	<b>4</b>
	1. GENERALITES.....	4
	2. LES PROTEINES RICHES EN PROLINES .....	6
	3. LE CHOIX D'UN PEPTIDE MODELE ET D'UNE PROTEINE COMPLETE.....	8
<b>C-</b>	<b>LES TANINS.....</b>	<b>10</b>
	1. LES DIFFERENTES FAMILLES DE TANINS DU VIN ET DU RAISIN.....	10
	2. LES TANINS CONDENSES .....	11
	3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES TANINS CONDENSES.....	13
	4. CHOIX D'UN TANIN MODELE .....	15
<b>D-</b>	<b>L'INTERACTION TANINS-PROTEINES .....</b>	<b>17</b>
	1. LES DIFFERENTS MODELES UTILISES .....	17
	2. LES TECHNIQUES UTILISEES .....	18
	3. LES MODELES PROPOSES ET LE TYPE D'INTERACTION .....	20
<b>E-</b>	<b>LES SUCRES DU VIN ET LEUR POSSIBLE ROLE DANS LES INTERACTIONS TANINS- PROTEINES .....</b>	<b>26</b>
	1. LES DIFFERENTES FAMILLES DE SUCRES PRESENTES DANS LES VINS .....	26
	<i>a. Les sucres simples.....</i>	<i>26</i>
	<i>b. Les polysaccharides du vin.....</i>	<i>27</i>
	2. INTERACTIONS DES SUCRES AVEC LES TANINS ET LES PROTEINES SALIVAIRES .....	30
	3. CHOIX DES SUCRES MODELES .....	32
<b>F-</b>	<b>OBJECTIFS ET PLAN DE LA THESE.....</b>	<b>34</b>

# CHAPITRE II : SYNTHESE DES PEPTIDES ET DES DIMERES DE PROCYANIDINES

<b>A- SYNTHESE PEPTIDIQUE .....</b>	<b>37</b>
1. PRINCIPE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE .....	37
a. <i>Stratégie de la synthèse</i> .....	38
b. <i>Isolement et Purification des peptides</i> .....	40
c. <i>Contrôle de la pureté</i> .....	41
2. APPLICATION AUX PEPTIDES MODELES .....	44
a. <i>Peptide IB9-14</i> .....	44
i. Synthèse et clivage .....	44
ii. Purification et contrôle de la pureté .....	45
iii. Résultats .....	46
b. <i>Protéine IB9-61</i> .....	48
i. Synthèse et clivage .....	48
ii. Purification et contrôle de la pureté .....	49
iii. Résultats .....	50
c. <i>Conclusion sur l'obtention des peptides</i> .....	52
<b>B- SYNTHESE DE DIMERES DE PROCYANIDINES .....</b>	<b>53</b>
1. SYNTHESE DES DIMERES B3, B6 ET DE TRIMERES .....	53
2. EXTRACTION DE DIMERES DE PROCYANIDINES .....	55
3. CONCLUSION SUR L'OBTENTION DES DIMERES DE PROCYANIDINES .....	55

# CHAPITRE III : METHODES ET ANALYSES RMN

<b>A- BREF RAPPEL DU PRINCIPE DE LA RMN .....</b>	<b>60</b>
<b>B- ANALYSE STRUCTURALE.....</b>	<b>64</b>
1. ATTRIBUTION DES SYSTEMES DE SPINS.....	66
2. ATTRIBUTION SEQUENTIELLE ET STRUCTURE.....	67
<b>C- ANALYSE DES INTERACTIONS .....</b>	<b>70</b>
1. ANALYSE DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES .....	70
<i>a. Les différents régimes d'échange .....</i>	<i>70</i>
<i>b. Analyses des variations de déplacements chimiques.....</i>	<i>71</i>
i. Cas des interactions tanins-protéines .....	71
ii. Cas de l'auto-association des tanins.....	72
2. ANALYSE DES COEFFICIENTS DE DIFFUSION.....	73
3. EXPERIENCES STD .....	76
4. EXPERIENCE HRMAS .....	80



# CHAPITRE IV : EFFET DES SUCRES SUR LE COMPOTEMENT COLLOIDAL DES TANINS

<b>A- PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>84</b>
1. MATERIELS.....	84
2. PREPARATION DES ECHANTILLONS .....	84
a. <i>Solution tampon utilisée .....</i>	<i>84</i>
b. <i>Préparation des échantillons .....</i>	<i>84</i>
i. Titration de l'EGCG.....	84
ii. Titration de la Gomme arabique.....	84
3. ENREGISTREMENT DES SPECTRES RMN.....	85
a. <i>Spectres proton .....</i>	<i>85</i>
b. <i>Spectres DOSY.....</i>	<i>85</i>
c. <i>Spectres HRMAS.....</i>	<i>86</i>
4. MESURE DE VISCOSITE .....	86
5. MESURE DE DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE.....	86
<b>B- INFLUENCE DES SUCRES SUR LE COMPORTEMENT COLLOÏDAL DE L'EGCG .....</b>	<b>87</b>
1. MESURE DES CONSTANTES D'ASSOCIATION .....	88
a. <i>Suivi du déplacement chimique .....</i>	<i>88</i>
b. <i>Mesure et suivi des coefficients de diffusion .....</i>	<i>90</i>
c. <i>Valeurs des différentes constantes d'association obtenues.....</i>	<i>90</i>
2. MESURE DES CONCENTRATIONS MICELLAIRES CRITIQUES .....	91
3. MESURE DE LA TAILLE DES MICELLES .....	93
4. BILAN SUR L'EFFET DES SUCRES TESTES EN SOLUTION.....	95
<b>C- EXPERIENCES HRMAS .....</b>	<b>98</b>
<b>D- TITRATION DE L'EGCG : ANALYSE DES SIGNAUX DES SUCRES .....</b>	<b>101</b>
1. ANALYSES QUANTITATIVES DES SIGNAUX.....	101
2. VALEURS DES CONSTANTES DE DISSOCIATION OBTENUES .....	103
<b>E- TITRATION DE LA GOMME ARABIQUE : ANALYSE DES SIGNAUX DE L'EGCG.....</b>	<b>105</b>
<b>F- EXPERIENCES DLS .....</b>	<b>107</b>
<b>G- DISCUSSION SUR L'EFFET DES SUCRES TESTES.....</b>	<b>110</b>

# CHAPITRE V :

## EFFET DES SUCRES SUR LES INTERACTIONS TANINS-PROTEINES

<b>A- PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>116</b>
1. MATERIELS.....	116
2. PREPARATION DES ECHANTILLONS .....	116
a. <i>Solution tampon utilisée .....</i>	<i>116</i>
b. <i>Préparation des échantillons .....</i>	<i>116</i>
i. Titration de l'EGCG.....	116
ii. Titration de la Gomme arabique.....	117
3. ENREGISTREMENT DES SPECTRES RMN.....	117
a. <i>Spectres proton 1D .....</i>	<i>117</i>
b. <i>Spectres proton 2D .....</i>	<i>117</i>
c. <i>Spectres Dosy.....</i>	<i>118</i>
d. <i>Spectres STD .....</i>	<i>118</i>
<b>B- ETUDE DU PEPTIDE IB9-14.....</b>	<b>119</b>
1. ATTRIBUTION DES RESONANCES DU PEPTIDE.....	119
a. <i>Attribution des résonances protons .....</i>	<i>119</i>
b. <i>Attribution séquentielle du peptide.....</i>	<i>121</i>
2. EFFET DES SUCRES SUR L'INTERACTION TANINS-PROTEINES .....	123
a. <i>Mise en évidence des sites de fixation.....</i>	<i>123</i>
b. <i>Mesure des constantes de dissociation.....</i>	<i>124</i>
c. <i>Valeur des paramètres d'interactions obtenus.....</i>	<i>127</i>
3. TITRATION DE L'EGCG : ANALYSE DES SIGNAUX DES SUCRES .....	128
a. <i>Analyse quantitative des signaux.....</i>	<i>128</i>
b. <i>Valeurs des constantes de dissociation obtenues.....</i>	<i>130</i>
4. TITRATION DE LA GOMME ARABIQUE : ANALYSE DES SIGNAUX DE L'EGCG .....	132
a. <i>Analyse quantitative des signaux de l'EGCG.....</i>	<i>132</i>
b. <i>Analyse quantitative des signaux du peptide.....</i>	<i>133</i>
c. <i>Bilan sur l'évolution de l'intensité des signaux de l'EGCG et du peptide.....</i>	<i>134</i>
5. DISCUSSION SUR L'EFFET DES SUCRES TESTES.....	135

<b>C- ETUDE DE LA PROTEINE IB9-61 .....</b>	<b>138</b>
1. ATTRIBUTION PARTIELLE DES RESONANCES DE LA PROTEINE .....	140
2. ETUDE DE L'INTERACTION AVEC DIFFERENTS TANINS.....	145
a. <i>Analyse des variations de déplacements chimiques et calcul de Kd .....</i>	<i>145</i>
b. <i>Détermination des sites de fixation du tanin .....</i>	<i>146</i>
3. BILAN SUR L'INTERACTION TANINS PROTEINE COMPLETE.....	149

## CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

<b>A- CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>152</b>
<b>B- PERSPECTIVES :.....</b>	<b>157</b>

## ANNEXES

<b>ANNEXE 1 : DEMONSTRATION DE L'EQUATION [III-C1<sub>3</sub>].....</b>	<b>159</b>
<b>ANNEXE 2 : DEMONSTRATION DE L'EQUATION [IV-D1].....</b>	<b>161</b>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# CHAPITRE I :

## INTRODUCTION

## A- Les composés du vin et la sensation d'astringence

Le vin est un milieu complexe constitué d'eau entre 85-90% et d'alcool sous forme d'éthanol de 10 à 15% qui solubilise de nombreuses molécules : tanins, protéines, sucres, acides [1]. Ces molécules présentes, en quantité plus faible, jouent un rôle majeur dans le goût et la qualité d'un vin.

L'examen d'un vin par les œnologues se réalise en trois étapes. Tout d'abord une analyse visuelle qui permet de définir la couleur et la robe du vin, ensuite une analyse olfactive afin de déterminer les différentes odeurs et arômes qui se dégagent et enfin une analyse gustative permettant de définir la structure et la qualité du vin.

La qualité d'un vin est donc jugée par sa structure et son équilibre à la fois au niveau du nez et de la sensation en bouche. Pour qu'un vin ait une structure dite équilibrée, un équilibre triangulaire doit exister entre trois facteurs clés, l'acidité, l'alcool et la présence de tanins [2].

La présence de tanins est donc un élément majeur déterminant la qualité d'un vin rouge et l'analyse gustative se voit fortement liée au potentiel tannique du vin dégusté. De plus, depuis des années, les œnologues relient la qualité d'un tanin à ses propriétés d'association et d'interaction avec les protéines, les alcaloïdes et les polysaccharides [3-5].

Cette propriété d'agréments des tanins avec les protéines joue un rôle majeur au cours de l'élevage du vin et aussi de son goût. Au cours de l'élevage des vins rouges, l'ajout de blanc d'œuf (contenant de l'albumine), de gélatine ou encore de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) permet de précipiter l'excès de tanins [6].

L'interaction entre les polyphénols du vin et les protéines salivaires sont à l'origine d'une sensation de sécheresse ressentie en bouche à l'issue de la dégustation d'un vin [7] : il s'agit de la sensation d'Astringence [8-10]. Cette sensation est une sensation qualifiée de tactile tant d'un point de vue physique [11] que perceptif [12]. Ce phénomène d'astringence est basé sur la somme de plusieurs effets tels qu'une contraction des tissus de l'épithélium buccal, une perte de lubrification, et une rugosité [13-15]. Cette sensation globale de sécheresse est liée à une forte interaction entre certains tanins et les protéines salivaires (et en particulier les Protéines Riches en Prolines, PRP) provoquant dans certains cas, la précipitation du complexe tanins-protéines à l'origine de la perte de lubrification [7, 16, 17]. Mais il faut nuancer, et ne pas automatiquement qualifier cette sensation de négative. En effet du côté gustatif les œnologues s'accordent à définir des « bonnes » et « mauvaises » astringences. Pour évaluer cette astringence, ils se basent sur une analyse de la description

sensorielle. Il leur a donc fallu créer un vocabulaire à partir de termes communs et pertinents permettant d'évaluer la sensation d'astringence [18, 19]. On retrouve ainsi des termes tels que desséchant, poussiéreux, granuleux pour définir une astringence trop forte ou des termes tels que doux, sensation de velours, marquant un bon équilibre tannique.

Mais, malgré la richesse du vocabulaire utilisé pour décrire un vin, l'analyse n'est pas simple, et laisse une part de subjectivité propre à chaque dégustateur. Chaque individu perçoit les goûts de manière différente en lien avec son environnement et ses origines, à la fois au niveau du patrimoine génétique, de la psychologie et de l'entraînement à la dégustation. De plus, chacun possède des taux de sécrétions salivaires plus ou moins importants et a donc une perception différente [20]. Ainsi même au sein d'un jury professionnel bien entraîné il peut exister des variations dues aux stimuli de l'environnement.

A travers cette définition, on se rend compte que l'astringence est liée à deux facteurs que sont les protéines salivaires et les tanins. Mais ces dernières années de nouvelles études mettent en évidence un rôle probable des sucres simples et polysaccharides. En effet plusieurs études mettent en évidence une baisse de la sensation d'astringence en présence de polysaccharides. Le mécanisme moléculaire mis en évidence est une dissociation des complexes tanins protéines en présence de sucres [21].

L'astringence et les interactions qui la régissent pourraient donc bien se représenter sous la forme d'un schéma à trois acteurs que seraient les tanins, les protéines salivaires et les sucres. Dans ce qui suit nous allons faire un état des lieux des connaissances sur chacun de ces trois acteurs et sur leurs interactions, en particulier au niveau moléculaire.

## B-Les protéines salivaires

### 1. Généralités

La salive est le suc sécrété par les glandes salivaires sous maxillaires, sublinguales et parotidiennes. Elle joue un rôle principal de lubrifiant et de protection de la muqueuse buccale et des dents ainsi qu'un rôle primordial dans la digestion des aliments et permet d'en apprécier le goût. Sa composition est régulée par le flux de salive et par les stimuli externes comme l'apport d'un aliment dans la cavité buccale. En effet Kallithraka *et al.* observent un changement de la distribution des protéines salivaires après dégustation d'un vin rouge [22].

De façon plus générale, la salive se compose à 99% d'eau dans laquelle sont dissous des électrolytes en plus faible quantité, des glycolipides, des glucides, des enzymes, de nombreuses protéines...[23, 24]. Mais il faut tout de même noter que les proportions de ces différents éléments varient également d'un individu à un autre [25-27].

Grâce au programme UCLA Human Salivary proteome project, le protéome salivaire complet a pu être décrypté. Il se compose de 1166 protéines [28]. avec une concentration moyenne de l'ordre de 3,5 mg/mL [29]. Ces protéines sont classées en différentes familles en fonction de leur rôle (Figure 1) [30] et de leur zone de production

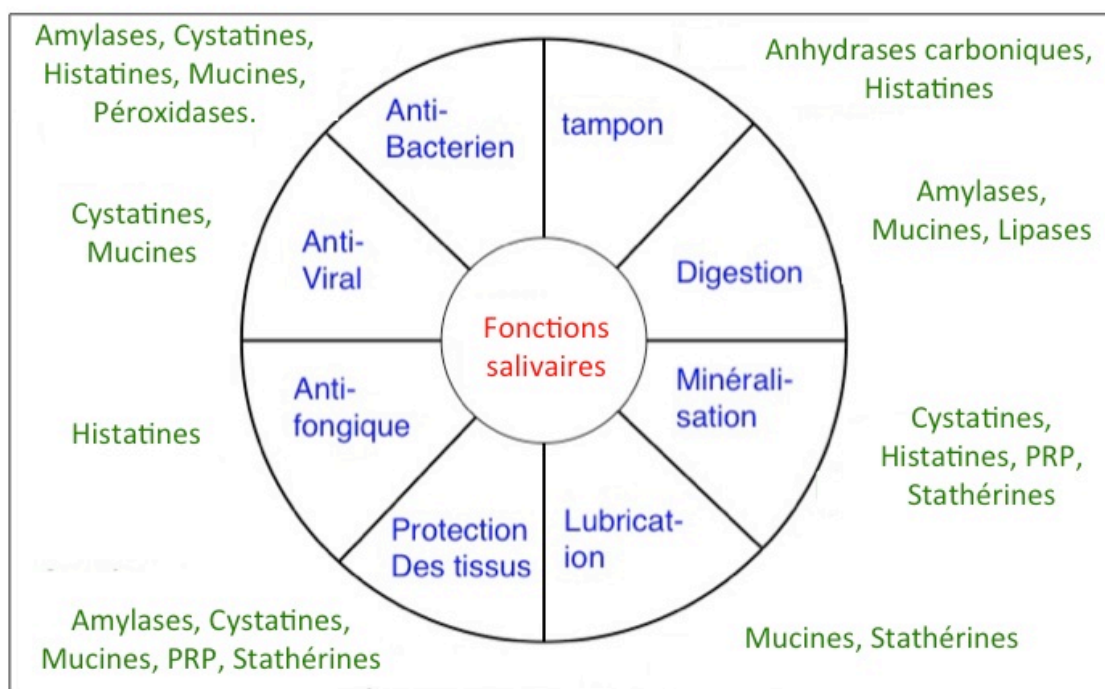


Figure 1 : Schéma des différentes fonctions de la salive et des familles de protéines impliquées. Adapté de M.J. Levine, 1993 [30].

Les 3 familles majoritaires que sont les mucines, les  $\alpha$ -amylases et les PRPs représentent 60% de la composition protéique salivaire (Figure 2) [31].

Les mucines sont des protéines glycosylées produites par les glandes submandibulaires et sublinguales [32]. Elles jouent un rôle essentiel dans la lubrification de la cavité buccale [33].

Les  $\alpha$ -amylases sont des enzymes digestives, il s'agit de glycosidases qui vont hydrolyser les polysaccharides et permettre une meilleure assimilation du glucose dans l'organisme. En agissant directement au niveau buccal, elles brisent les liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amylose et de l'amylopectine pour donner des molécules de maltose.

Les PRPs sont quant à elles, produites par les glandes parotides. Elles ont la capacité de faire précipiter, dans certains cas, les polyphénols. D'autres molécules telles que les Histamines, les statherines, cystatines, mucines et  $\alpha$ -amylase présentent également des affinités pour les tanins [34], mais les PRPs restent la famille de protéines la plus impliquée dans ce mécanisme d'interaction et a donc attiré notre attention.

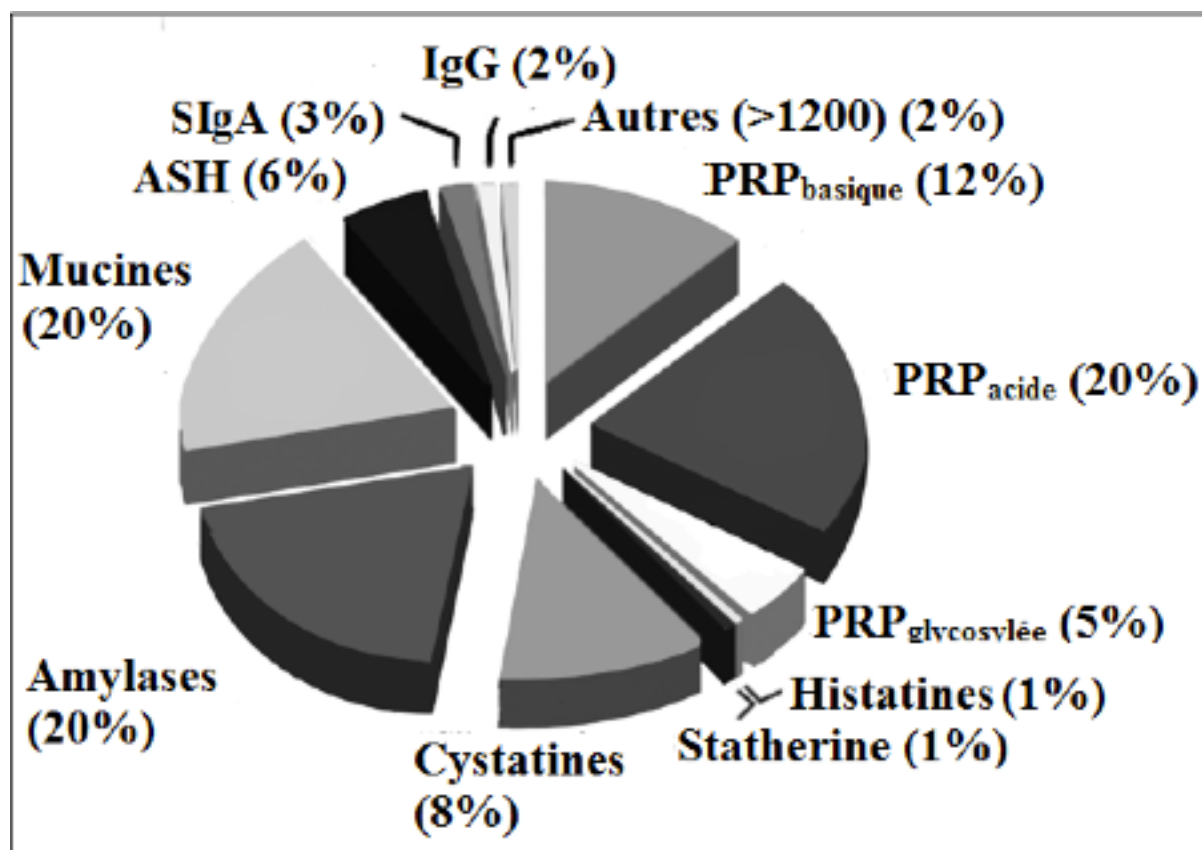


Figure 2 : Répartition des protéines majoritaires de la salive humaine. ASH : Albumine du Sérum Humain ; SIgA : sérum d'immunoglobuline A ; IgG : Immunoglobuline G ; PRP : Protéine riche en proline. D'après Scarano et al. 2010 [31].



## 2. Les Protéines Riches en Prolines

Les PRPs représentent, à elles seules, plus de 2/3 des protéines secrétées par la glande parotide et par le conduit submandibulaire [35, 36]. Ces protéines ne sont présentes qu'en faible concentration au sein de la cavité buccale, car elles ne sont produites en masse qu'en présence d'un agent activateur. En effet, la présence d'agents activateurs comme les tanins, induit une forte augmentation de leur concentration.

A ce jour, plus d'une vingtaine de PRPs ont été découvertes [37] et sont classées en trois familles, les PRP acides, les PRP glycosylées [29] et les PRP basiques. Toutes ces protéines sont codées par seulement 6 gènes dotés d'un fort polymorphisme [38]. Parmi eux, deux codent pour les PRPs acides, les autres pour les basiques et les glycosylées [39].

Les PRP acides représentent la plus grande famille avec 45% des PRPs au total. Ces protéines ont la particularité de posséder des sites de liaison spécifique de l'ion calcium avec un nombre de sites variables en fonction des protéines [40]. Elles pourraient agir comme un réservoir à calcium permettant le maintien de l'homéostasie calcique dans la bouche [29]. En effet, des études montrent qu'elles lient le calcium et inhibent la croissance des cristaux d'hydroxyapatite à la surface des dents [37, 41] et qu'elles jouent un rôle dans la stabilisation des sels de phosphate de calcium dans la salive [42].

Les PRP glycosylées représentent quant à elles 25% des PRPs totales. Elles jouent un rôle de lubrification [43] et fixent les bactéries buccales [44]. Elles jouent ainsi un rôle de protection, une augmentation de leur concentration entraînant une diminution de la formation de caries [45]. Plus récemment, un rôle antiviral a été mis en évidence par leur liaison à une protéine du manteau du HIV-140 [46].

Les PRP basiques représentent les 30% restants et ne présentent aucun rôle spécifique encore identifié. Elles sont en revanche connues pour leur forte capacité à lier les tanins. L'ensemble des PRPs possède cette propriété mais les PRPs basiques, de part leur structure fibrillaire, semblable à une hélice collagène, ont une meilleure aptitude à neutraliser les effets parfois néfastes des tanins alimentaires par complexation et précipitation [47-49]. Elles peuvent ainsi présenter, grâce à cette propriété, un rôle protecteur contre le potentiel toxique et cancérigène de certains tanins alimentaires [47, 50, 51]. En effet, des études montrent que les PRPs liant les tanins pourraient prévenir du cancer de l'œsophage [52].

Les PRPs glycosylées et les PRPs basiques sont exprimées à partir de 4 gènes (PRB1 à PRB4) possédant de nombreux allèles localisés sur le chromosome 12. Ce grand nombre d'allèles aboutit à une grande variété de protéines produites [53-55].

La structure primaire des protéines de cette famille est marquée par un fort polymorphisme en longueur de chaîne mais également par un haut degré de similarité. En effet, pour chaque gène, un précurseur est traduit puis est clivé par des convertases par protéolyse post-transcriptionnelle ce qui explique le haut degré de similarité entre les différentes protéines [56]. Il existe 95% d'identité entre IB7, IB8c et IB9, ainsi qu'une forte homologie entre IB5 et IB4 pour plus de 70%, mis en évidence par Saitoh *et al.* [57, 58].

On retrouve ainsi des séquences polypeptidiques ubiquitaires dans cette population de protéines comme l'illustre la figure 3.

1	SPPGKPQGPPQ	EGNNPQGPP-P	-----	PAGGNPQQPQ	APPAGQPQGPPRPPQGGRP	51	IB4
1	SPPGKPQGPPQ	EGNKPQGPP-P	PGKPQGPP	PAGGNPQQPQ	APPAGKPQGPPPPPQGGRP	59	IB5
1	SPPGKPQGPP	PQGGNQPQGPP	PPGKPQGPP	PQGGNKPQG-P	PPPGKPQGPP--QGDNK	57	IB7
1	SPPGKPQGPP	PQGGNQPQGPP	PPGKPQGPP	PQGGNKPQG-P	PPPGKPQGPP--QGGSK	57	IB8c
1	SPPGKPQGPP	PQGGNQPQGPP	PPGKPQGPP	PQGGNKPQG-P	PPPGKPQGPP--QGDKS	57	IB9
	*****	* ** :	***** *		* ** *		** * : ***** **
52	SRPPQ-----	56					
60	PRPAQQQPPQ	70					
58	SR-----	59					
58	SRSA-----	61					
58	RSPR-----	61					

Figure 3 : Alignement des séquences de 5 PRPs (IB4, IB5, IB7, IB8c et IB9) obtenu à l'aide de la fonction Align du site UniProt. En rouge sont représentés les acides aminés conservés.

L'ensemble de ces protéines est composé de 70 à 85% par trois résidus la proline ( $40\% \pm 2$ ), la glycine ( $21\% \pm 2$ ) et la glutamine ( $17\% \pm 3$ ). On comprend ainsi mieux leur nom de Protéines Riches en Proline choisi par le fait que les prolines représentent près de la moitié des acides aminés de ces protéines. Il est intéressant de remarquer que la plupart des protéines usuelles ne comportent pas plus de 5% de prolines dans leurs séquences.

Au sein de ces séquences primaires, on retrouve de nombreux domaines conservés entre les différentes PRPs comme le montre l'alignement de séquences de la figure 3. Il s'agit d'une séquence d'une soixantaine d'acides aminés représentant 80% d'identité avec toutes les séquences protéiques de cette famille et entièrement représentée par les protéines IB7 de 59 acides aminés et IB9 de 61 acides aminés.

Ces domaines conservés sont représentés par des micro-séquences inscrites en tandem dans la chaîne peptidique avec un nonapeptide PPGKPQGPP répété 3 fois et un pentapeptide PQGPP répété 5 fois.

La présence de ces motifs riches en proline renforce la spécificité et l'homogénéité de ce type de protéines dont la structure secondaire apparaît comme une hélice de type II [59]. En effet, la présence de nombreuses prolines, de part leur structure spatiale, restreint la

conformation de la chaîne carbonée et défavorise la formation d'hélice  $\alpha$ . De plus, le proton amide est remplacé par un groupe  $\text{CH}_2$ , rendant ces prolines incapables d'agir en tant que donneur de liaison hydrogène [60]. Ainsi, la torsion induite par ces prolines au sein de la chaîne peptidique rendrait beaucoup plus accessible le groupement carbonyle et permettrait à ces prolines d'agir comme accepteur de liaison hydrogène [3, 61]. C'est cette propriété qui permettrait au PRPs de fixer les tanins.

### 3. Le choix d'un peptide modèle et d'une protéine complète

Les PRPs représentent une des plus grandes familles de protéines salivaires, marquées par une grande variété de protéines avec une forte similarité en terme de séquences. La sous-famille des PRPs basiques est également connue comme étant la plus affine pour les tanins [3]. Au sein de ce groupe, deux protéines voient leur séquence reprise en intégralité dans la majorité des autres, la protéine IB7 [62], et la protéine IB9 [63] (Figure 3).

IB9 est une des plus grandes PRPs. Elle se compose de 61 résidus dont 3 acides aminés majeurs : 26 prolines (43%), 13 glycines (21%) et 9 glutamines (15%) composant ainsi 79% de la chaîne peptidique.

Au sein de sa séquence un fragment de 12 acides aminés PPGKPPGPPQG est répété à 3 reprises et on retrouve également le pentapeptide PPGPP répété 5 fois (Figure 4).

SPPGKPPGPPQGG<sup>14</sup>NQPQGPPPPGKPPGPPQGGNR<sup>37</sup>  
PPGPPPGKPPGPPQGGDKSRSPR<sup>61</sup>

Figure 4 : Structure primaire de la protéine salivaire IB9-61. En rouge se trouve représenté un motif de 12 résidus répété 3 fois, et souligné se trouve représenté un pentapeptide répété 5 fois. Ces deux fragments sont identiques à ceux présents chez IB7. D'après Isemura et al. 1982 [63].

Cette protéine IB9 possédant ce segment de 12 amino acides répétés a donc semblé intéressante à utiliser en tant que modèle. En effet, une étude séquentielle est facilement envisageable, en commençant par un premier peptide puis en l'agrandissant progressivement au cours des études. Ce fut le choix de C. Simon et O. Cala qui commencèrent par synthétiser la partie N-ter de la protéine IB7 appelée IB7-14, (NterSPPGKPPGPPQGG14...) [59, 64], représentant un motif très ubiquitaire dans l'ensemble de la population des PRPs, puis un peptide plus long IB9-37 représentant les 37 premiers résidus d'IB9-61 [65].

Dans notre cas, nous avons choisi de synthétiser dans un premier temps un peptide IB9-14 (séquence identique à IB7-14) correspondant à la partie N-ter de la protéine IB9, facile à synthétiser et représentatif du fragment unitaire et ubiquitaire des PRPs, puis dans un second temps la protéine complète IB9-61.

L'étude de ces deux peptides de 14 et 61 acides aminés couplée à l'étude d'O. Cala sur le peptide intermédiaire de 37 acides aminés [65] va ainsi nous permettre d'avoir une vision globale de l'effet de la longueur de la chaîne peptidique dans les interactions tanins-protéines.

## C-Les tanins

La première définition physico-chimique des tanins a été donnée en date, par Bate, Smith et Swain [7, 66], il s'agit de « composés phénoliques solubles dans l'eau, possédant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da, qui en plus de la réactivité usuelle des composés phénoliques, ont une capacité à faire précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines ». Cette participation aboutissant à la formation de colloïdes dont la dimension est comprise entre 10 nm et 1 mm environ.

Le terme tanin sert donc à désigner toute une catégorie de composés naturels de nature polyphénolique. Ces tanins sont localisés dans les feuilles, l'écorce et les fruits de nombreuses plantes et font partie intégrante de notre alimentation (vin, thé, divers fruits...).

### 1. Les différentes familles de tanins du vin et du raisin

En œnologie, ces composés phénoliques ont un rôle essentiel à la fois au niveau de la couleur et du goût d'un vin. En plus de leurs propriétés organoleptiques, ils interviennent dans la matière colorante du vin de part les anthocyanes libres ou combinées aux tanins [67, 68].

Les tanins font partie de la famille des polyphénols caractérisés par leurs nombreux groupements phénoliques. A partir de cette famille, ils se séparent en deux grandes catégories selon la nature chimique du polyphénol de base qui les compose : les tanins condensés et les tanins hydrolysables [69] (Figure 5).

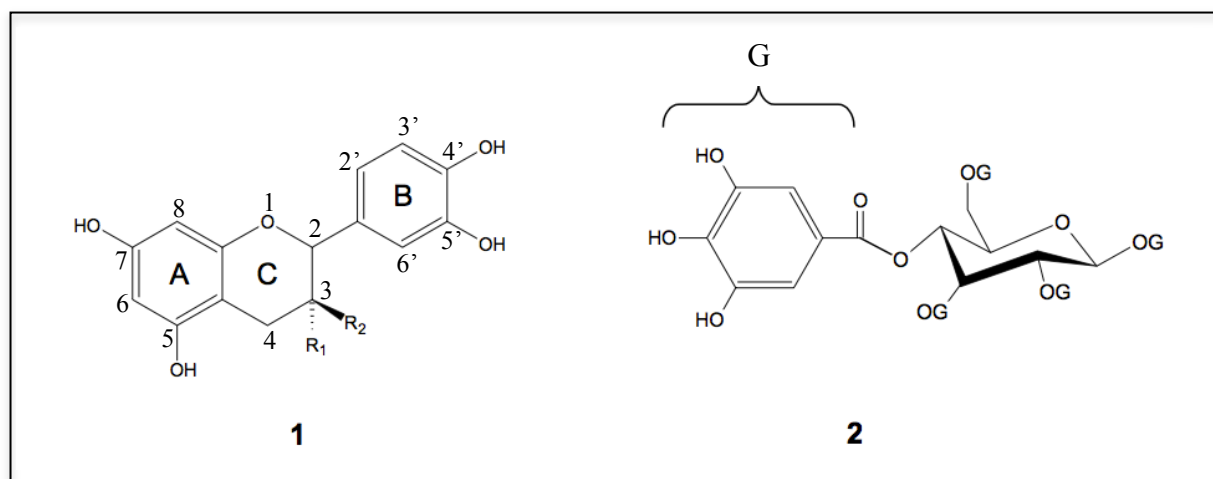


Figure 5 : Structure d'un tanin condensé (1), le monomère flavan-3-ol (épicatechine :  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$  ou catéchine :  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ) et d'un tanin hydrolysable (2), le penta galloyl glucose (le plus représenté des gallotanins) ; A : cycle phloroglucinol ; B : cycle catéchol ; C : cycle pyrane ; G = acide gallique. Adapté de L. Bravo 1998 [69].

Les tanins hydrolysables sont des esters de l'acide gallique ou ellagique estérifiés avec le glucose dont le pentagalloyl-D-glucose est le précurseur [70]. Ils forment ainsi deux groupes les gallotanins et les ellagitanins. Les tanins condensés quant à eux, ont pour unité de base le noyau flavane. Ce sont des procyanidines ou des polymères de flavane-3-ol avec la (+)-catechine ou la (-)-épicatchine comme unité structurale. Ces deux familles de tanins se trouvent présentes dans le vin mais ont des origines différentes.

Les tanins condensés proviennent des parties solides du raisin, des pépins [71] et de la pellicule [72, 73]. On les retrouve dans le vin à des concentrations importantes variant de 1 à 4 g/L en fonction du cépage, de la nature du sol, des conditions climatiques, de vinification... Les tanins hydrolysables quant à eux proviennent du bois, ils sont transférés de la barrique au vin au cours de l'élevage, lorsque le vin est élevé en fût de chêne. Leur concentration est moindre et n'atteint pas plus d'une centaine de mg par litre de vin [74].

## 2. Les tanins condensés

On retrouve les tanins condensés dans de nombreux fruits et produits alimentaires tels que le thé, le chocolat, le café, le vin [75, 76]. Ils font partie de la famille des flavonoïdes et dérivent d'un noyau flavane composé de 15 carbones organisés en C6-C3-C6 [76]. Leur grande diversité résulte du nombre et de la position de groupe hydroxyles sur les noyaux aromatiques A et B, de la stéréochimie des carbones asymétriques du cycle pyrane C, ainsi que du nombre et du type de liaison entre les unités monomériques. Leur masse est comprise entre 500 et 20000 Da en fonction de leur degré de polymérisation et leur origine dans différents tissus de plantes [15, 76].

Ces tanins sont également appelés proanthocyanidines, de part leur capacité à libérer des anthocyanidines de couleur rouge par rupture de la liaison interflavane, lors de leur traitement acide et en condition d'oxydation.

Nous ne parlerons dans cette description que des oligomères de flavan-3-ols, aussi appelés procyanidines, qui ont la catéchine ou l'épicatéchine comme unités constitutives. La seule différence entre ces deux molécules repose sur la stéréochimie du carbone 3 où la stéréochimie du groupement hydroxyle du cycle pyrane C est S pour la catéchine et R pour l'épicatéchine (Figure 6).

Les procyanidines représentent une famille de tanins avec une diversité moléculaire infinie provenant des deux différentes unités constitutives, des deux types de liaisons interflavanes possibles reliant les monomères entre eux en C4-C6 ou C4-C8 [77] (Figure 6), et du degré de polymérisation. Ainsi, on peut s'attendre à 8 dimères différents, 32 trimères, 128 tétramères... chacun d'entre eux pouvant être ou non galloylé sur la fonction alcool du carbone 3 de l'hétérocycle.

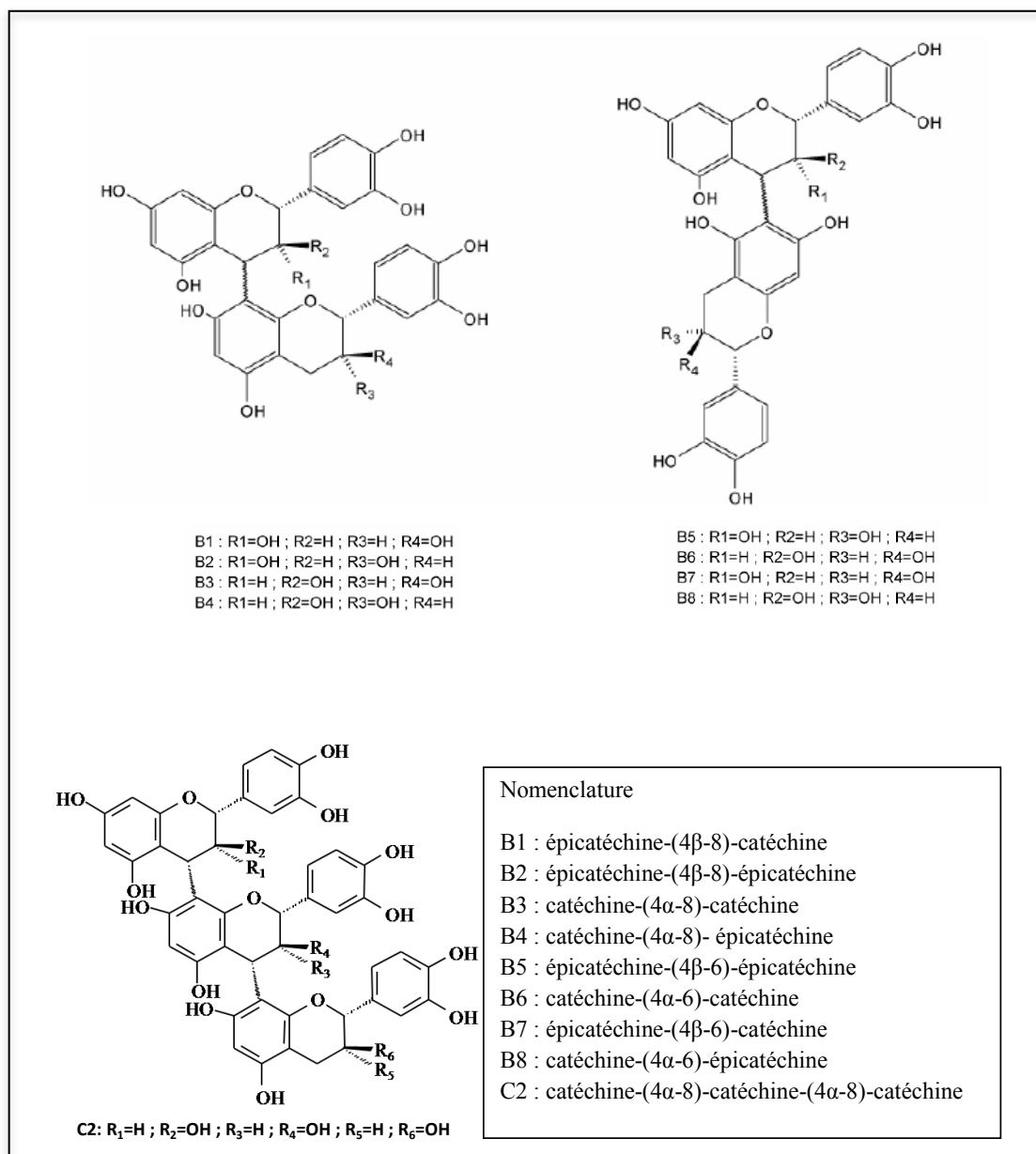


Figure 6 : Structure et nomenclature des procyanidines de type B : dimères liés en C4 – C8 (en haut à gauche), et en C4 – C6 (en haut à droite) et un trimère lié en C4 – C8 - C4 – C8 (en bas à gauche). Adapté de De Freitas et al. 1998 [77].

Du côté de leur structure tridimensionnelle, les procyanides peuvent adopter plusieurs conformations. Ces différentes formes sont en lien : soit avec la conformation E ou A de l'hétérocycle pyrane C plaçant le cycle B en position équatoriale ou en position axiale, soit avec une isomérisation rotationnelle autour de l'angle dièdre C3-C4-C8-C7 ou C3-C4-C6-C7 entre deux unités flavanols. Ce second cas offre la possibilité aux dimères de procyanidines d'adopter 2 formes, une compacte et une étendue [78]. La proportion entre ces deux formes rotamères dépend de la nature du substituant [79, 80] et de la procyanidine.

Ainsi Tarascou *et al.* [81] ont montré que, dans un milieu type vin ( $H_2O/EtOH$  : 90/10, v/v), les procyanidines B1 et B3 adoptaient majoritairement une conformation compacte, tout comme le type B4, avec respectivement 95% et 75%, alors que les procyanidines B2 sont sous forme d'un ratio équimolaire avec 50% de chaque forme (Figure 7).

Les procyanidines trimères, quant à elles, peuvent exister sous quatre formes rotamères en raison des rotations possibles autour des deux liaisons interflavanes [82]. Ainsi les trimères peuvent adopter une structure compacte-compacte, compacte-étendue, étendue-compacte ou étendue-étendue. La procyanidine C2 dans un milieu mimant le vin peut adopter indifféremment ces quatre formes, la forme compacte-compacte restant tout de même majoritaire [82, 83] (Figure 7).

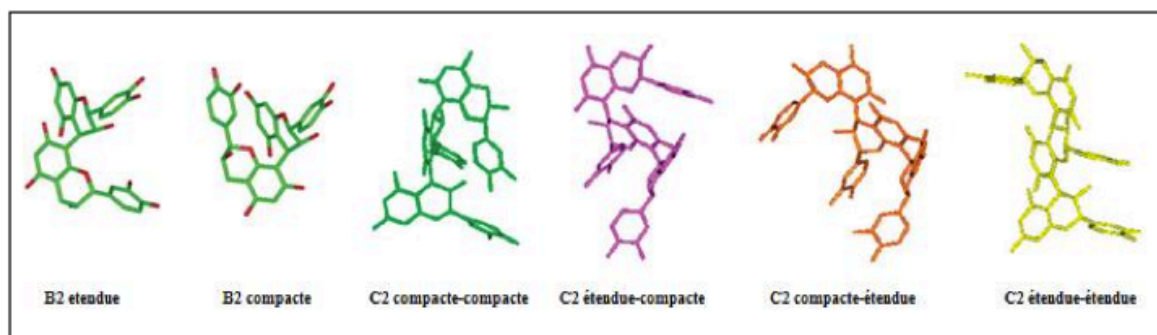


Figure 7 : Structure tridimensionnelle des procyanidines B2 (deux formes à gauche) et C2 (quatre formes à droite). D'après Tarascou *et al.* 2006-2007 [82, 83].

### 3. Propriétés physico-chimiques et biologiques des tanins condensés

Comme nous l'avons vu précédemment, les tanins condensés se caractérisent par leur capacité à s'associer avec les PRPs. Mais cette propriété physico-chimique n'est pas la seule. Des études récentes montrent également leur capacité à interagir avec les lipides via l'étude de liposomes modèles ( $\mu m$ ) mimant la cavité buccale et de bicelles isotropes (nm) mimant les gouttelettes lipidiques présentes dans l'alimentation. Cette interaction tanins-lipides entraîne



une déstabilisation des bicelles, qui pourrait provoquer une modification des perceptions organoleptiques lors de l'ingestion d'aliments riches en lipides simultanément à la dégustation de vin [84].

D'autre part, au cours de l'élevage d'un vin, les tanins condensés peuvent également réagir avec d'autres composés phénoliques présents dans le vin tels que les anthocyanes ou les ellagitannins, ou se complexer entre eux pour former des micelles ou agrégats. Ces réactions peuvent ainsi modifier la couleur et les caractéristiques organoleptiques du vin [85].

Baxter *et al.* furent les premiers à décrire l'auto-association des tanins sous la forme d'un modèle simple dans lequel chaque tanin s'associe aux autres avec la même constante d'association  $K_a$ , on parle d'un modèle isodesmique [86].

Pianet *et al.* en 2008 confirment ce modèle et observent qu'au delà d'une certaine Concentration Micellaire Critique (CMC), un processus de micellisation des procyanidines se met en place induisant la formation de petites micelles d'un diamètre de l'ordre du nanomètre. Cette étude ayant été réalisée à la fois sur des monomères, dimères, trimères de procyanidines, Pianet *et al.* ont pu mettre en évidence une échelle d'affinité représentant la capacité de chaque type d'oligomère à s'auto-associer (Figure 8). En effet, dans un milieu type vin, l'auto association des monomères se produit avec une constante d'affinité d'environ  $40 \text{ M}^{-1}$  avec des CMC autour de  $10 \text{ mM}$ , contre des constantes d'affinité d'environ  $6 \text{ M}^{-1}$  pour les dimères et trimères avec des CMC beaucoup plus élevées de l'ordre de  $20 \text{ mM}$  [87]. Ce phénomène d'auto-association est favorisé, au niveau structural, par des interactions hydrophobes de type  $\pi$ - $\pi$  stacking entre les cycles aromatiques des tanins (Figure 9).

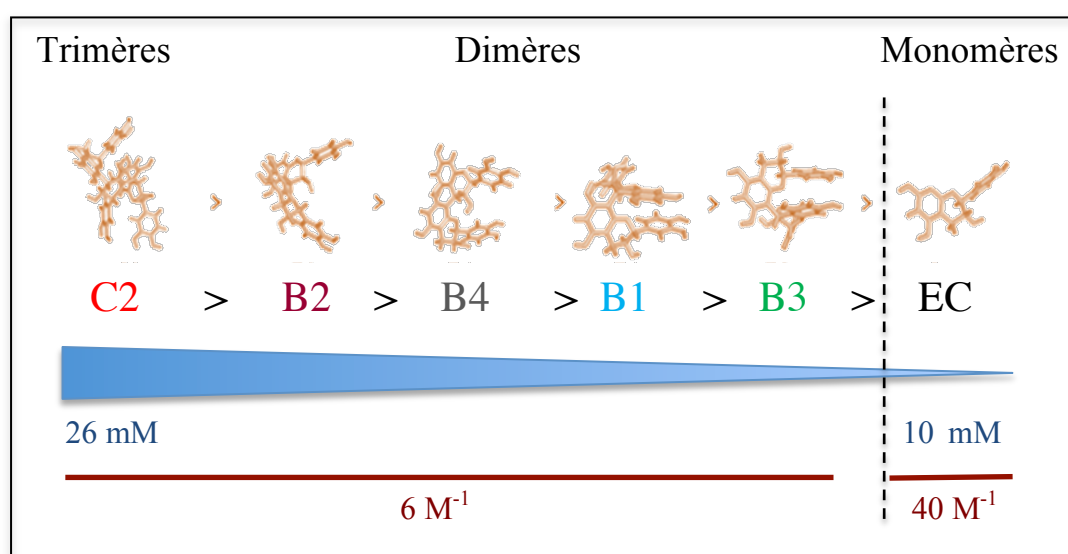


Figure 8 : Echelle d'affinité de l'auto association des tanins en fonction de leur degré de polymérisation, avec en bleu les valeurs de CMC et en rouge les valeurs de  $K_a$ . Adapté de Pianet *et al.* 2008 [87].

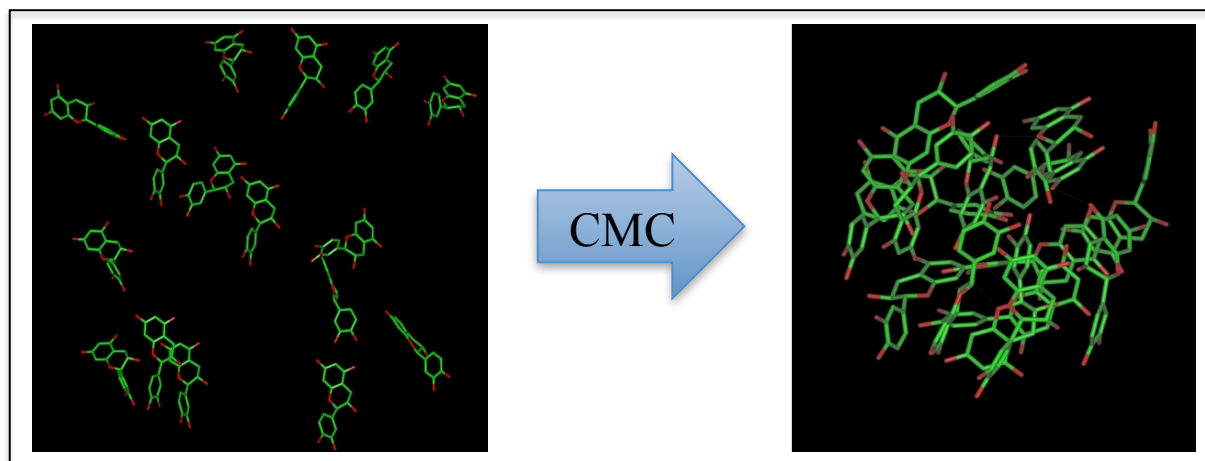


Figure 9 : Formation d'une micelle de catéchine et visualisation de l'effet de  $\pi-\pi$  stacking. Adapté de Pianet et al. 2008 [87].

Ce comportement colloïdal est un phénomène majeur, il va définir la fraction de tanins susceptible d'interagir avec les protéines, ainsi que le mode d'interaction avec ces protéines.

Ces propriétés d'auto-association des tanins mais aussi leurs capacités à interagir avec les protéines et à chélater les métaux confèrent aux procyanidines de nombreux rôles biologiques [88]. Chez les plantes, le rôle majeur sera un rôle de protection contre les infections et les insectes [89]. Chez l'homme, de nombreux rôles bénéfiques ont également été mis en évidence tels qu'une action antioxydante, une action contre les maladies cardiovasculaires, contre les cancers, ainsi que des rôles d'agent antimicrobien, antiviral, et neuroprotecteur [29, 89-91].

Une grande partie de ces propriétés est liée à la capacité d'interaction des tanins avec des protéines cibles. C'est ainsi, à travers leurs interactions avec les protéines de la salive, qu'ils peuvent jouer un rôle gustatif majeur.

#### 4. Choix d'un tanin modèle

Dans le cadre de notre étude de l'impact des sucres sur les interactions tanins-protéines, nous avons, tout d'abord, dû nous confronter au choix d'un tanin type pour commencer nos études. En effet nous avons déjà choisi un peptide et une protéine salivaire modèle, et le fait de choisir un tanin modèle nous permet de fixer deux paramètres et va permettre de pouvoir faire varier le troisième, les sucres afin d'observer leur impact.

Pour cela nous avons voulu utiliser un tanin abondamment présent dans les vins et facile à synthétiser ou à trouver commercialement. Nous nous sommes donc spontanément tourné vers la famille des monomères.

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, il existe une échelle d'affinité des tanins en fonction de leur constante d'auto-association et leur valeur de CMC [87, 92]. Or, les études d'interactions, comme nous le verrons plus loin, exigent de se trouver dans des conditions de concentrations tanniques inférieures à la valeur de CMC. Ces restrictions nous ont donc poussés à choisir un tanin monomère ayant une valeur de CMC assez élevée, nous avons donc sélectionné pour cela l'epigallocatechine-gallate (EGCG) (Figure 10).

Ce tanin est principalement présent dans le thé et est fortement représenté au sein des vins rouges avec des concentrations de l'ordre de 27 à 96 mg/L [93].

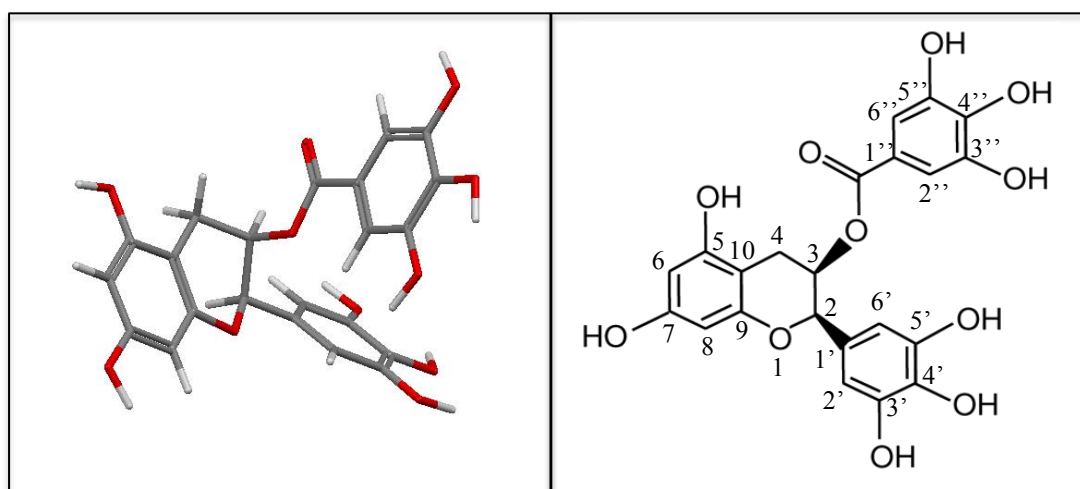


Figure 10 : Structure tridimensionnelle (à gauche) et structure plane numérotée (à droite) de l'epigallocatechine-gallate.

Il s'agit d'un monomère qui résulte de l'estérification de l'épicatéchine avec l'acide gallique et dont le cycle B possède 3 groupements hydroxyles (groupement galloyl). Le grand nombre de groupements hydroxyles de ce tanin le rend facilement soluble dans l'eau ou dans une solution hydroalcoolique, contrairement à son homologue non galloylé. Il possède une masse de 458,37 g/mol qui est proche de la taille des dimères et le place donc à une taille intermédiaire entre les monomères et les trimères, ce qui en fait un tanin représentatif de la famille des tanins condensés. Enfin, on peut en avoir de grandes quantités puisqu'on le trouve dans le commerce.

Pour toutes ces raisons, l'EGCG sera utilisé comme modèle principal dans les études qui vont suivre. Cependant d'autres tanins issus de synthèse (B6, B3) ou d'extraction (B2g) ont également été utilisés pour élargir la gamme de tanins testés.

## D- L'interaction tanins-protéines

La majeure partie des propriétés des tanins repose sur la capacité des polyphénols à interagir avec les protéines. Ainsi depuis plus d'une vingtaine d'années de nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur l'étude de ces interactions et la recherche de modèles d'associations et de précipitations. Pour cela, diverses techniques à la fois au niveau macromoléculaire ou moléculaire ont été mises en œuvre en utilisant divers modèles de protéines ou de tanins.

### 1. Les différents modèles utilisés

Pour réaliser ces études, de nombreux modèles de protéines ont été utilisés. La plus retrouvée dans la littérature est l'albumine de sérum de bœuf (BSA), une protéine de transport modèle véhiculant à travers le système sanguin des molécules bioactives, comme les acides gras, l'hémine voire les polyphénols [3, 94-96]. La gélatine [95] et la  $\beta$ -caséine [97] ont également été étudiées. Ces protéines présentent une structure fibrillaire liée à la présence de nombreuses prolines qui permettent de les comparer aux PRP et présentent des affinités pour les tanins jusqu'à 100 fois supérieures à la BSA.

Dans les analyses qui suivent nous nous focaliserons sur les études d'interactions avec les protéines salivaires modèles. Pour cela nous retrouvons de nombreuses études réalisées sur l' $\alpha$ -amylase [94, 98], ou sur les histatines [99-101], mais les plus étudiées actuellement restent les PRP. L'étude de ces PRPs étant réalisée soit sur des protéines entières IB8c [94], IB5 [102, 103], soit sur des fragments peptidiques représentatifs [64, 65, 104].

L'ensemble de ces protéines ont été étudiées en interactions avec de nombreux types de tanins, en passant par les tanins hydrolysables comme les tri-, tetra- ou penta-galloyle glucose [96, 105], et en allant jusqu'aux tanins condensés. Pour ces tanins condensés, de nombreux degrés de polymérisation ont été utilisés tels que des monomères de catéchine ou épicatechine [96, 105, 106], d'épigallocatechine gallate [97, 107], ainsi que des dimères [104, 105, 108] ou encore des trimères [64]. Des fractions de procyanidines obtenues après extraction et dont le degré de polymérisation moyen a été déterminé ont également été utilisés par certaines équipes [94, 109].

## 2. Les techniques utilisées

L'ensemble de ces modèles protéines / tanins a été analysé grâce à diverses techniques macromoléculaires et moléculaires.

Du point de vue macromoléculaire, l'ensemble des techniques employées se base principalement sur les propriétés de diffusion de la lumière. On retrouve des expériences de néphélométrie permettant de mesurer la turbidité d'une solution [110, 111], de diffusion dynamique de la lumière [112]. Mais également des expériences de titration calorimétrique [96], de dichroïsme circulaire [112], de mesure de radioactivité [3, 108], ou encore de centrifugation analytique [97]. Des expériences d'imagerie par microscopie électronique à transmission ont également été utilisées par Jöbstl *et al.* [97].

D'autre part, du point de vue moléculaire, de nombreuses techniques ont été adaptées dans l'objectif d'étudier les interactions tanins-protéines. On trouve ainsi des techniques de spectrométrie de masse [103, 113, 114] et de résonance plasmonique de surface [115]. Mais également des techniques de RMN couplées ou non à de la modélisation moléculaire après obtention de données et contraintes RMN [82, 87, 104, 116, 117]. Il faut également noter que les méthodes de cristallographie sont très peu utilisées de par la difficulté à obtenir des cristaux de protéines qui diffractent suffisamment pour des protéines peu ou pas structurées [118]. La RMN reste donc une technique majeure et largement mise en œuvre pour décrire les interactions tanins-protéines d'un point de vue moléculaire [64, 81, 104-107, 112, 119, 120].

L'ensemble de ces données et de ces études est donc réalisé à partir de nombreuses techniques et conditions expérimentales différentes et avec une grande diversité de modèles de protéines et de tanins (Tableau 1). Il semble donc difficile à partir de ces grandes quantités de données d'aboutir à des conclusions communes et comparables tant au point de vue de l'affinité des différents tanins pour les protéines qu'au point de vue de la stoechiométrie du complexe. Cependant de grandes tendances se sont dessinées, comme une échelle d'affinité pour les tanins condensés allant des monomères les moins affins aux tanins de plus hauts degrés de polymérisations [64, 105, 121]. Les tanins condensés sont également plus affins que les tanins hydrolysables. L'ensemble de ces études met aussi en évidence une importance de la nature protéique ainsi que la structure et la flexibilité des tanins sur l'affinité de l'interaction [104].

## Chapitre I Introduction

Niveau d'observation	Protéines	Tanins	Méthodes	Observation	Equipes et références
macromoléculaire	BSA	Différents polyphénols	Néphélometrie / turbidité	Certains carbohydrates ont une influence sur la solubilité des complexes tanins-protéines en formant des agrégats	De Freitas <i>et al.</i> [98]
	BSA et gelatine	Tanins de diverses plantes (thé, raisin, sorgho)	Titration calorimétrique	Affinité différente des tanins pour la BSA et pour la gélatine	Frazier <i>et al.</i> [96]
	BSA	Divers polyphénols (Ellagitanin, Gallotanin, ou procyanidine)	Mesure de radioactivité de la BSA	Spécificité des interactions, affinité relative des différents tanins, types de liaisons : liaisons non covalentes, hydrophobes pour les tanins hydrolisables, hydrogènes pour les tanins condensés	Hagerman <i>et al.</i> [3, 108]
	$\beta$ - caséine	Epigallocatechine gallate	Microscopie électronique à transmission et ultracentrifugation analytique	Interaction provoquant des précipitations du complexe formé	Jöbstl <i>et al.</i> [97]
	PRP	Divers tanins	Diffusion dynamique de la lumière, titration par microcalorimétrie et de dichroïsme circulaire	Etudes de l'agrégation d'une PRP suite à la fixation de tanin.	Pascal <i>et al.</i> [112]
Moléculaire	PRP	Divers tanins (catéchine EGCG....)	Spectrométrie de masse	Stœchiométrie du complexe tanins-protéines formé, stabilité	Cheynier et Canon [103, 113, 114]
	Topo-isomérase	Vescalagine (un ellagitanin)	Résonance plasmonique de surface	Détermination de l'interaction tanins-protéines	Douat-Casassus <i>et al.</i> [115]
	Fragments de PRP	Divers tanins	La modélisation moléculaire et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	Schéma d'interaction type de liaisons et affinités	Pianet <i>et al.</i> [64, 81, 82, 87, 104]

Tableau 1 : Récapitulatif des modèles et techniques d'analyses des interactions tanins-protéines trouvés dans la littérature.

### 3. Les modèles proposés et le type d'interaction

A partir de l'ensemble de ces observations, la communauté scientifique s'accorde autour d'une description d'interaction / précipitation qui a évolué au cours des années. Cinq modèles peuvent ainsi être répertoriés de façon chronologique et présentent à la fois des similarités et des discordances.

Un premier modèle fut proposé par Haslam en 1981 [122], à partir d'analyses d'interactions entre polyphénols et BSA, grâce à des études de dialyses à l'équilibre et de microcalorimétrie. Ce modèle comprend deux étapes. Une première au cours de laquelle un ou plusieurs tanins viennent se fixer sur la protéine en formant une monocouche diminuant leur caractère hydrophile (Figure 11A). Puis une seconde étape au cours de laquelle les tanins joueraient un rôle d'agent pontant, grâce à leur propriété multidentate, qui permettrait au premier complexe d'interagir avec une autre protéine. Ces étapes peuvent ainsi se répéter jusqu'à obtention d'un complexe final composé de plusieurs protéines pontées entre elles par les tanins conduisant au phénomène de précipitation (Figure 11B). Il s'agit d'un phénomène réversible : en effet, le précipité formé peut toutefois être à nouveau solubilisé par l'ajout de protéines [106], chacune d'entre elles ne pouvant lier qu'un nombre fixe de polyphénols [123]. Il semblerait également que l'ajout de polysaccharides entraînerait également une resolubilisation du complexe, en entrant en compétition avec les protéines pour la fixation du tanin [106].

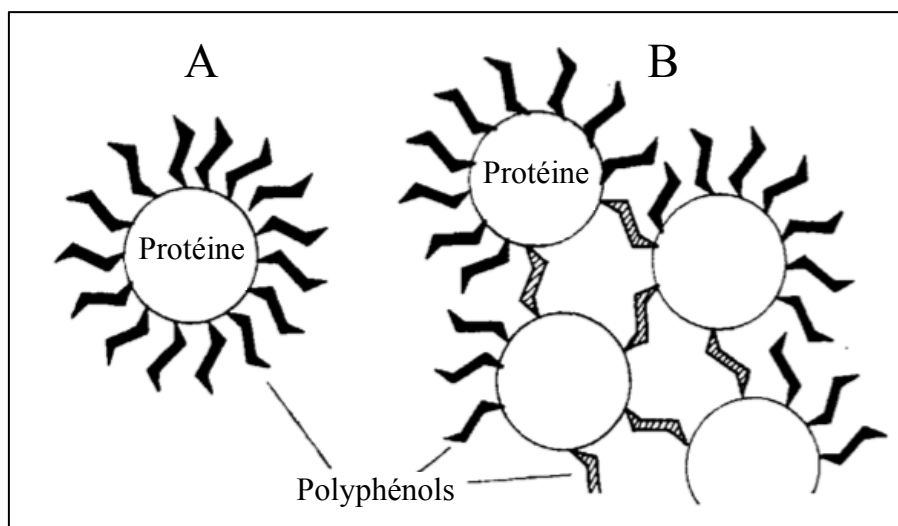


Figure 11 : Modèle de Haslam 1981. Différents mécanismes d'interaction entre protéines et tanins sont mis en avant en fonction de la concentration en protéine (faible en A et forte en B). Avec dans un premier temps, formation d'une monocouche de polyphénol sur la protéine, à faible concentration en protéine A ; et dans un second temps un pontage des protéines par les polyphénols, à plus forte concentration en protéine avec formation de complexes à plusieurs protéines provoquant la précipitation. Adapté de Haslam 1981 [122].

Un deuxième modèle fut proposé par Siebert *et al.* en 1996 [124] après des études d'interaction de catéchine et d'acide tannique sur plusieurs peptides (gélatine, gliadine, lysozyme, papaïne, ou polypeptide synthétique), à travers des études de diffusion de la lumière. Il s'agit d'un mécanisme de liaison basé une nouvelle fois sur des interactions hydrophobes. D'une part, les acides aminés non polaires peuvent gêner la formation de complexes en favorisant le repliement des régions hydrophobes de la molécule vers l'intérieur, les rendant ainsi inaccessibles.

Alternativement, ces mêmes acides aminés peuvent favoriser la formation de complexes, s'ils agissent en coopérant avec un résidu proline adjacent pour augmenter l'activité du site de liaison. D'autres acides aminés peuvent agir stériquement ou électrostatiquement sur la complexation [124].

Ce système prend cette fois-ci en considération les ratios tanins-protéines (Figure 12). En effet selon Siebert *et al.* chaque protéine présente un nombre fixe de site de liaison aux tanins et les tanins posséderaient deux (ou plus) extrémités pouvant se lier aux protéines. Ainsi à concentration égale en tanins et protéines, un réseau maximal est observé correspondant à de larges colloïdes. En excès de protéines les polyphénols ne peuvent fixer que deux protéines et forment des particules plus petites. Et en excès de tanins, l'ensemble des sites de la protéine se trouve saturé par les tanins. L'accès d'un tanin déjà fixé à une protéine au site d'une autre protéine est donc plus difficile, rendant ainsi le pontage impossible. Cela résulte en la formation de particules de plus petites tailles.

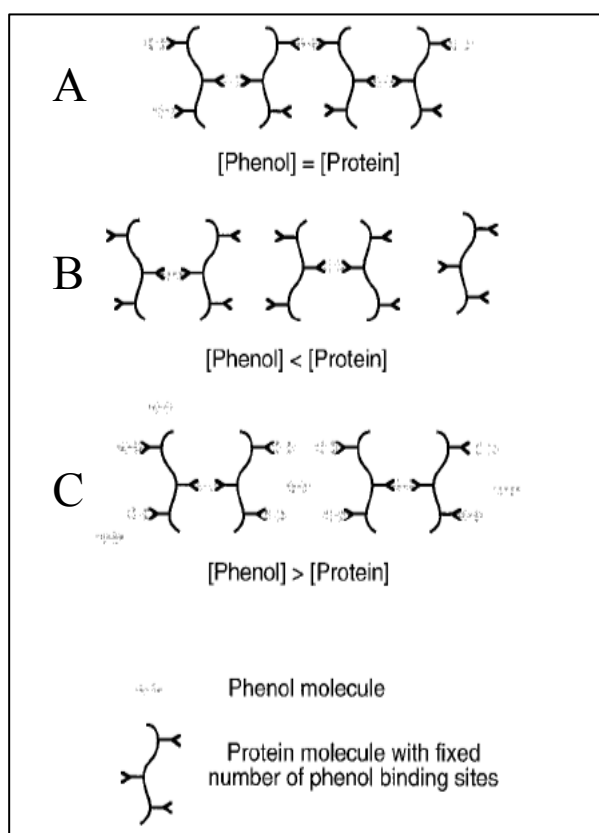


Figure 12 : Modèle de Siebert *et al.* 1996. Dans ce modèle, les polyphénols peuvent fixer les protéines par leurs deux extrémités et les protéines possèdent un nombre limité de sites de fixation. Trois types d'interactions sont décrits en fonction du ratio phénol/protéine ; A : à ratio égal un réseau maximal est observé ; B : en excès de protéine, les phénols ne peuvent fixer que 2 protéines. C : en excès de phénol, tous les sites de la protéine sont saturés en phénol et le pontage de deux protéines est rendu plus difficile. Adapté de Siebert *et al.* 1996 [124].



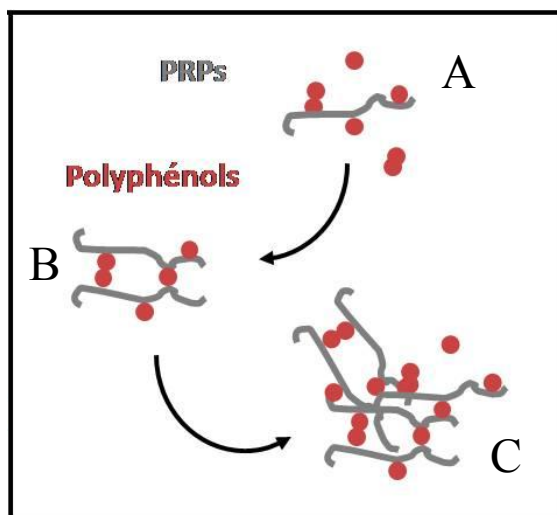


Figure 13 : Modèle de Charlton *et al.* 2002, d'interaction polyphénols-protéines en trois étapes : avec fixation des tanins à plusieurs sites de la protéine (A), suivi du pontage entre deux protéines par l'intermédiaire des tanins préalablement fixés (B), et finalement pontage de plusieurs protéines avec agrégation du complexe formé. D'après Charlton 2002 *et al.* [107].

Un troisième modèle proposé est le modèle de Charlton *et al.* basé sur des analyses de diffusion de la lumière, de microscopie électronique et de RMN, étudiant l'interaction d'EGCG et d'EGC avec différentes PRP, histatines ou bradykinines [107] (Figure 13).

Ce modèle propose un schéma d'interaction en 3 étapes avec une première étape de fixation de tanins multidentes sur plusieurs sites de la protéine, dans une seconde étape ces tanins fixés à une protéine se pontent à une seconde protéine pour former un dimère de protéines, et finalement dans une troisième étape ces dimères de protéines complexés par les tanins s'agrègent en formant de larges complexes conduisant à la précipitation.

Ce modèle fut ensuite repris et étendu en 2004 par Jobstl *et al.* proposant ainsi un quatrième modèle à partir d'une étude biophysique complète (par diffusion dynamique de la lumière, diffusion des rayons X aux petits angles, dichroïsme circulaire, et microscopie électronique à transmission) de l'interaction entre l'EGCG et la  $\beta$ -caséine [97] (Figure 14).

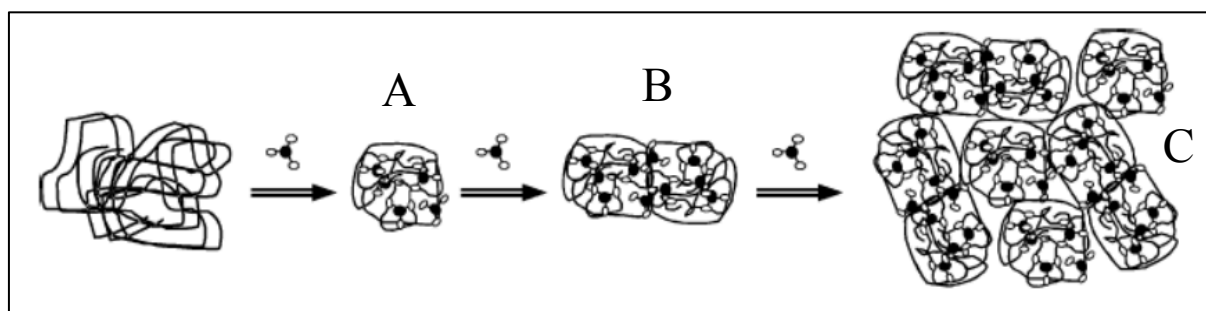


Figure 14 : Modèle de Jobstl *et al.* 2004. Dans ce modèle trois étapes sont proposées. Un tanin au cours de la première étape peut se fixer à plusieurs sites de la protéine de part son pouvoir multident et entraîner un repliement et un compactage de la protéine (A). Dans une seconde étape, un pontage entre protéine a lieu avec formation de dimères par l'intermédiaire des tanins préalablement fixés (B), pour aboutir dans un troisième temps au pontage de plusieurs protéines entraînant la précipitation du complexe (C). D'après Jobstl *et al.* 2004 [97].

En gardant trois étapes, Jobstl *et al.* proposent un système où cette fois-ci les tanins au cours de la première étape vont pouvoir se fixer sur plusieurs sites de la protéine de part leur propriété multidentante. Cela va ainsi induire un repliement et un compactage de la protéine.

Dans un second temps, lorsque la concentration en tanins augmente, les tanins fixés à la surface de la protéine vont se ponter avec une autre protéine et former des dimères de protéines produisant l'insolubilité. Et finalement comme dans le modèle de Charlton, dans une 3ème étape les dimères de protéines tanins formés s'associent et provoquent la précipitation du complexe.

Le modèle le plus récent fut proposé au laboratoire par Cala *et al* en 2011. Ce modèle tient compte de l'importance de la structure des tanins [125] (Figure 15). En effet, pour des concentrations inférieures à la CMC du tanin étudié, Cala *et al* ont mis en évidence une influence de la conformation des tanins sur le mode d'interaction. D'une part, lorsqu'ils adoptent une conformation ouverte tels que le dimère B2 ou le trimère C2, les groupements phénoliques sont accessibles et favorables à la formation de liaisons hydrogènes permettant de lier deux peptides et conduisant à l'initiation d'un réseau tanins-peptides pouvant conduire au phénomène de précipitation. D'autre part, lorsqu'ils adoptent une conformation majoritairement compacte, favorisant la formation de liaison  $\pi$  tels que les dimères B3, B1 et B4, les tanins peuvent interagir avec un seul peptide ne provoquant pas la précipitation du complexe. D'un autre côté, au dessus de leur CMC, les tanins forment des colloïdes de manière préférentielle et ces colloïdes sont par la suite capables d'interagir avec les peptides à la fois par des liaisons hydrophiles et des liaisons hydrophobes pouvant aboutir à la précipitation du système.

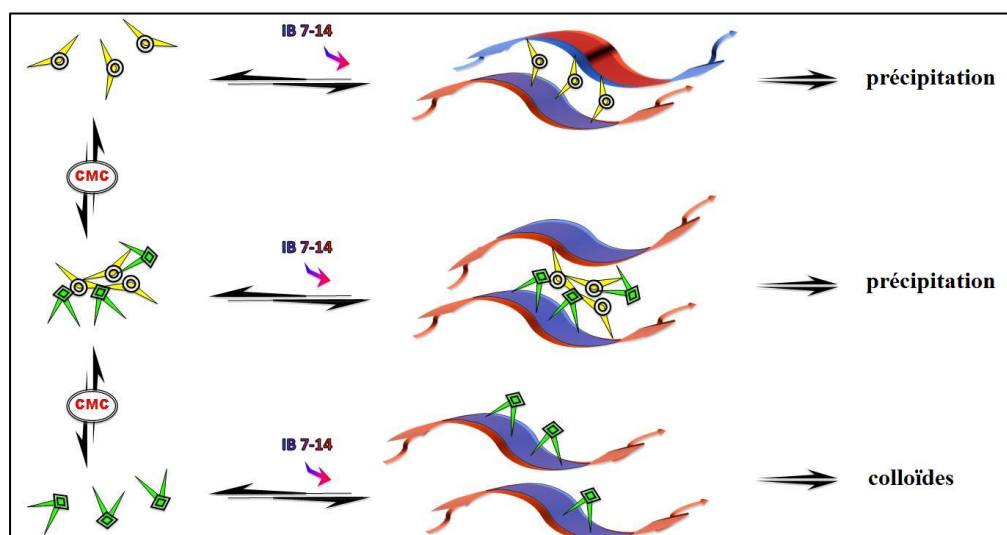


Figure 15 : Modèle de Cala *et al.* 2011. Différents mécanismes représentant l'interaction entre les procyanidines et le peptide IB7-14 conduisant à la formation d'un précipité ou à la formation de simples colloïdes. Phénomène dépendant de l'état d'agrégation des tanins (sous la CMC des tanins les molécules sont libres (vert (en bas à gauche) et jaune (en haut à gauche)), au dessus de la CMC, formation de micelle (mélange vert et jaune (au milieu à gauche)) et de leur conformation préférentielle (compacte en vert et étendue en jaune)). D'après Cala *et al.* 2011 [125].

L'ensemble de ces modèles présente donc de fortes similarités quant aux différentes étapes aboutissant à la formation de complexes tanins-protéines et provoquant la précipitation.

En revanche pour ce qui est des interactions entrant en jeux, plusieurs écoles s'affrontent, avec 3 types de liaisons observées (Figure 16) :

Tout d'abord, Murray *et al.* [119] mettent en avant une interaction majoritairement hydrophobe entre les cycles polyphénoliques des tanins et le noyau pyrrolidine de la proline. D'un autre côté plusieurs équipes proposent la mise en place de liaisons hydrogènes. Ces dernières interviendraient entre les groupements hydroxyles des phénols et le C=O de la proline. La proline grâce à sa fonction amide tertiaire, augmenterait la capacité de la fonction carboxylique à accepter une liaison hydrogène [104, 126, 127]. Enfin, Clifford *et al.* ont mis en évidence des interactions de type ionique, sous forme de liaisons électrostatiques avec les anions phénolates, mais qui sont absentes aux conditions de pH acide du vin [128].

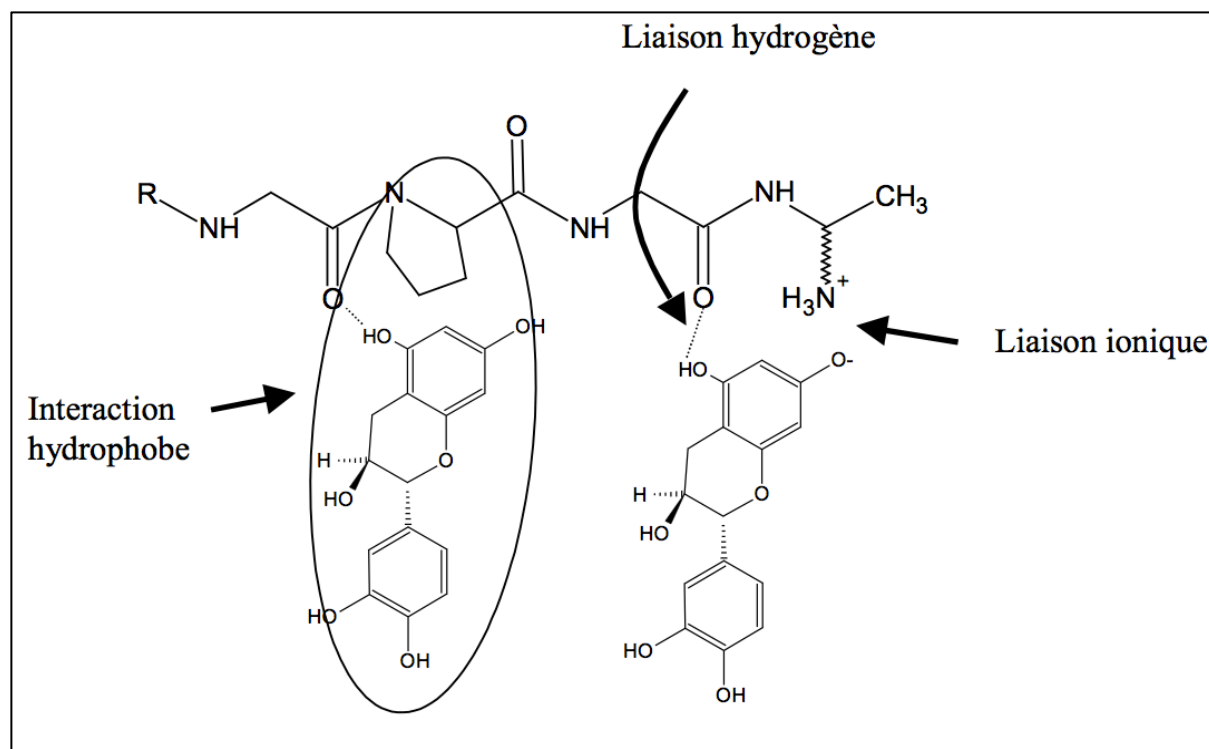


Figure 16 : Nature des interactions entre protéines et polyphénols. Ces interactions peuvent être de 3 types : interactions hydrophobes (A) [119], liaisons hydrogènes (B) [104, 126, 127] et liaisons ioniques (C) [128].

Ainsi, même si les types d'interactions entrant en jeux dans la complexation tanins-protéines ne font pas encore l'unanimité, la communauté s'accorde à mettre en avant une importance de la structure tridimensionnelle des protéines et des tanins.

La présence en tandem de résidus proline, glycine et glutamine dans la séquence des PRPs leur confère une structure ouverte et étendue, plus exposée au solvant, sous forme

d'hélice de type II, facilitant l'approche des tanins. Il est communément admis que la conformation du squelette proline, la restriction de la conformation du résidu précédant la proline et la nature de l'amine et du carbonyle font de ce résidu un site préférentiel pour l'interaction avec les polyphénols [106]. En effet, il n'existe pas de séquences spécifiques d'interaction mais plutôt des sites précis d'interactions comme a pu le montrer Cala *et al.* sur le peptide IB7-14 qui présente 3 sites de fixation indépendamment des tanins utilisés [64]. Ces derniers ont également mis en évidence que la longueur et le type de protéines rencontrées modifiaient ces interactions. En effet en passant d'un peptide de 14 acides aminés à un de 37 on ne retrouve plus que 2 sites de fixations mais avec une affinité accrue. Le nombre de sites ne dépend donc pas linéairement de la longueur du peptide, mais surtout de l'évolution de sa conformation au fur et à mesure des différentes fixations de tanin [65].

La nature et le degré de polymérisation des tanins utilisés influent également sur l'affinité des interactions avec une évolution croissante en rapport avec le degré de polymérisation des tanins étudiés [64, 129].

Ainsi, pour continuer l'étude de ces interactions, il est donc important d'essayer de garder une homogénéité entre les études en se rapprochant le plus possible des conditions naturelles du point de vue des concentrations, solvants, pH, force ionique, et nature des molécules impliquées. C'est pourquoi nous avons voulu au cours de cette thèse nous rapprocher le plus possible du milieu du vin en étudiant les interactions avec les différents types de sucres présents dans le vin après élevage.

## E-Les sucres du vin et leur possible rôle dans les interactions tanins-protéines

Les sucres sont présents depuis le raisin lui même jusqu'au vin mis en bouteille après élevage. Cependant leurs concentrations évoluent tout au long du processus de fabrication du vin. En particulier, l'action d'enzymes, notamment au cours de la fermentation alcoolique, induit une transformation chimique des sucres et une diminution considérable de leurs concentrations. Ainsi, dans les études qui vont suivre nous nous focaliserons sur les sucres et leurs concentrations finales en bouteille même si nous évoquerons leurs origines.

### 1. Les différentes familles de sucres présentes dans les vins

Les sucres du vin peuvent être classés de différentes façons soit par leur origine, issus de la grappe ou bien produits ou dégradés par glycolyse ou fermentation, soit par leur structure. Dans notre cas, nous avons choisi de séparer les sucres « simples », ou monosaccharide de sucres chimiquement plus complexe, les polysaccharides.

#### a. Les sucres simples

Les sucres simples sont classiquement appelés glucides ou saccharides. Il s'agit de molécules polyfonctionnelles portant de nombreuses fonctions alcool et carbonyle qui sont produites par photosynthèse au niveau de la feuille de vigne. On parle souvent de sucres réducteurs lorsque la fonction carbonyle est libre et peut exercer un pouvoir réducteur laissant prévoir une grande réactivité chimique, biochimique et métabolique de ces sucres simples.

Au départ le mou de raisin contient de 15 à 25% de glucides, représentant approximativement 150 à 250 g/L de sucres, composés à 99% par des Hexoses comme le glucose et le fructose (Figure 17) et à 1% de pentose comme le xylose et l'arabinose. Au cours de la maturation du raisin, la proportion de fructose augmente et à maturité, le rapport glucose/fructose est proche de 0,95. Ces sucres sont des sucres fermentescibles et lors de la fermentation alcoolique, ils vont être dégradés en éthanol et en autres produits secondaires (1° d'éthanol nécessitant 16,5 à 18 g/L de sucre) [6]. A l'issue d'une fermentation complète, les vins secs ne présentent que de faibles quantités d'hexoses de l'ordre de 1 g/L.

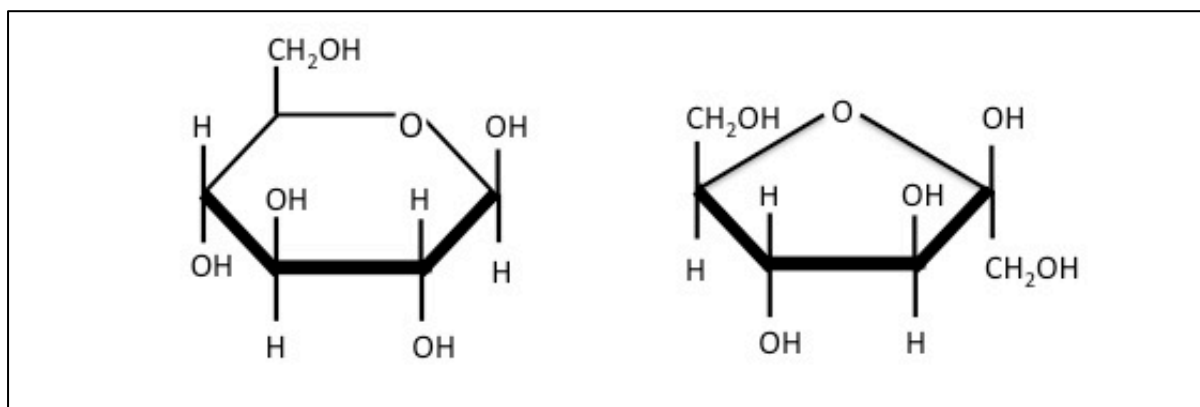


Figure 17 : Structures cyclisées du D-glucose (gauche) et du D-fructose (droite).

D'autre part, ces molécules de sucres simples présentent un caractère polyfonctionnel par la présence d'un groupement carbonyle, aldéhyde, ou cétone qui leur confère une grande réactivité exploitée en œnologie pour le dosage des sucres, principalement aux travers de réactions d'oxydo-réductions [6].

Si on relie à ces sucres leur pouvoir sucrant, on peut également classer le glycérol dans les sucres simples. En effet, même si cette affirmation fait débat ces dernières années, le glycérol reste reconnu par les œnologues comme une molécule conférant au vin sa saveur sucrée. Dans les vins rouges le glycérol peut être présent jusqu'à des concentrations de 10 g/L.

### b. Les polysaccharides du vin

Les polysaccharides que l'on retrouve dans le vin peuvent, quant à eux, avoir deux origines distinctes. Ils peuvent provenir soit de la baie de raisin comme les sucres simples, soit des parois des levures utilisées pour la fermentation alcoolique.

Les polysaccharides issus de la paroi des levures sont des mannoprotéines (MP). Il s'agit de protéoglycanes composées à 20% de protéines et 80% de chaînes de mannoses liées en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6),  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) et  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3). Elles présentent des masses molaires de 5000 à plus de 400000 g/mol et on les retrouve dans les vins à des concentrations de l'ordre de 100 à 150 mg/mL. Ces polysaccharides sont libérés dans le mou dès le début de la fermentation [130, 131].

En ce qui concerne les polysaccharides pectiniques issus de la baie de raisin (Figure18) [132], on en distingue deux grandes classes, les polysaccharides riches en arabinose et galactose (PRAG) et les rhamnogalacturonanes (RG).

La classe des PRAGs regroupe principalement les arabinogalactanes (AG-II) et les arabinogalactane-protéines de type II (AGP). Les AG-II sont libérés par dégradation enzymatique durant la macération des parties solides de la baie. Ils se composent de 6 à 15% d'acides glucuroniques et d'environ 2% d'acides galacturoniques [133]. Ils sont constitués d'une chaîne principale de  $\beta$ -D-galactopyranose liés en (1 $\rightarrow$ 3) et ramifiés en O-6 par de courtes chaînes de  $\beta$ -D-galactopyranose liés en (1 $\rightarrow$ 6) pouvant être elles-même substituées en O-3, ou par de courtes chaînes d' $\alpha$ -L-arabinofuranoses liés en (1 $\rightarrow$ 4). Les AGP sont des AG-II liés à une cupule protéique représentant environ 2 à 10% de la masse du polysaccharide et caractérisée par la présence d'hydroxyproline. Les AGP sont solubles et sont libérés dès le début de la vinification. La teneur en PRAG est généralement comprise entre 100 et 200 mg/L dans les vins rouges [134].

La classe des ramnogalaturonanes se compose de deux polysaccharides majeurs RG-I et RG-II. RG-I est un hétéropolymère composé par la répétition du disaccharide [ $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA- (1 $\rightarrow$ ] qui peut-être répété plus de 100 fois [135]. RG-II quant à lui, est composé d'un squelette homogalacturonique constitué de 8 à 10 résidus d'acide galacturonosyls liés en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) et substitués par 4 chaînes latérales principales : A, B, C et D [136, 137]. Ces chaînes oligosaccharidiques contiennent onze monosaccharides différents. Des études par RMN ou modélisation ont été menées pour déterminer la conformation de ce méga-oligosaccharide [136, 138]. L'abondance de RG-II dans les parois de la baie de raisin et sa résistance aux dégradations enzymatiques en font l'un des polysaccharides majeur des vins [139]. La concentration du RG-II est donc plus importante que celle de RG-I, avec des valeurs comprises entre 80 et 150 mg/L dans les vins rouges.

L'ensemble de ces polysaccharides sont donc présents dans le vin de manière naturelle, mais il faut aussi noter que lors de l'élevage du vin d'autres polysaccharides exogènes peuvent être ajoutés afin d'améliorer ses qualités gustatives.

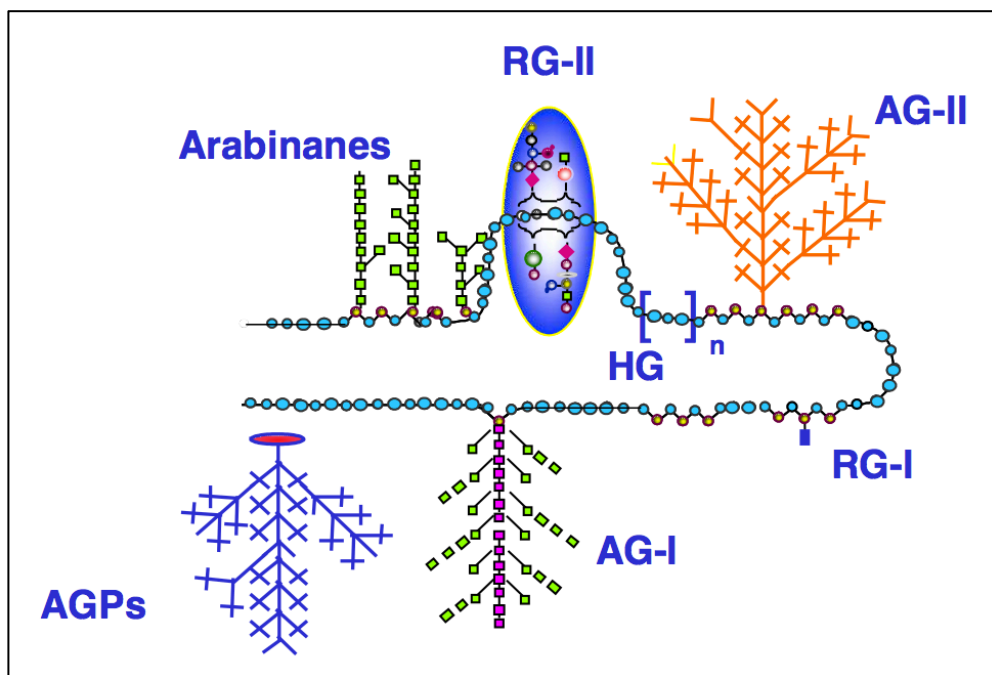


Figure 18 : Les différents polysaccharides pectidiques issus de la paroi de la baie de raisin. La chaîne principale des pectines est constituée d'acide galacturonique avec des motifs particuliers que sont les rhamnogalacturonanes (RG-I, RG-II), et les chaînes latérales sont composées des arabinanes, des arabinogalactanes (AG-I, AG-II) et des arabinogalactanes protéines (AGP). D'après Doco et al. 1995 [132].

D'autres polysaccharides peuvent également être ajoutés au cours de la vinification, il s'agit de polysaccharides exogènes : c'est le cas par exemple de la gomme arabique et de la pectine.

La gomme arabique est un polysaccharide d'environ  $10^6$  Da composé de 40 à 45% de D-galactose, de 25 à 30% de L-arabinose, de 10 à 15% de L-rhamnose et de l'acide D-glucuronique et dont la chaîne principale est constituée par un enchainement de D-galactose. Ce polysaccharide se trouve, parfois associé à une fraction protéique composée d'hydroxyproline et de sérine, représentant 2% de la masse totale du sucre. Il est issu de la sève de certains arbres et principalement de l'acacia.

La gomme arabique est ajoutée au vin en tant que stabilisateur de la limpidité. En effet ce polysaccharide est supposé jouer le rôle de colloïde protecteur en empêchant la floculation des colloïdes instables [140]. En plus de ce rôle protecteur, un effet positif de sa présence sur les qualités organoleptiques du vin a été mis en évidence par un panel de dégustateurs après diverses filtrations très serrées [141]. Les concentrations moyennes de gomme arabique sont de l'ordre de 100 à 200 mg/L de vin.

Les polysaccharides pectiniques présentent le même rôle de colloïdes protecteurs.



## 2. Interactions des sucres avec les tanins et les protéines salivaires

Comme nous venons de le voir il existe donc un grand nombre de sucres présents dans le vin, des plus simples jusqu'aux polysaccharides, et présents dans la bouteille à des concentrations parfois très différentes. Les effets de la présence de ces différents sucres sur les qualités organoleptiques du vin et sur la stabilisation de sa couleur ont été mis en évidence depuis plus de 25 ans [109] et ont été associés à leur action inhibitrice au niveau des interactions tanins-protéines depuis 20 ans [106]. Deux aspects ont été développés au cours de ces 2 dernières décennies à travers d'une part, des études sur l'interaction tanin-polysaccharides, et d'autre part des études sur l'inhibition des interactions tanins-protéines.

Du côté de l'étude sur les interactions tanins-polysaccharides, plusieurs études structurales ont été réalisées :

Des études de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont montré que les polysaccharides n'inhibent pas l'agrégation initiale des tanins entre eux mais affectent l'évolution en taille des particules formées [142].

Différents polysaccharides ont été étudiés, les monomères d'AGP0 et de RG-II ne présentent aucun effet alors que les Mps et les AGP4 acides présentent une forte inhibition de l'agrégation des tanins. En revanche les RG-II dimères mettent en évidence une forte augmentation de la taille des particules suggérant une possible co-agrégation selon Riou *et al.*

D'autres études sur les Mps mettant en évidence une baisse de leur propriété d'agent stabilisant lorsque leur masse moléculaire augmente ont poussé Poncet-Legrand *et al.*, à conclure qu'un facteur stérique lié à la nature du polysaccharide joue un rôle important dans ces interactions [143]. Ces derniers ont donc proposé un modèle où les polysaccharides à haut poids moléculaire n'affectent pas l'agrégation des tanins, leur grande taille les faisant flocculer avec les tanins, alors que des polysaccharides de petite taille moléculaire vont proposer de plus grandes surfaces d'interaction et limiter ainsi l'interaction entre tanins par gêne stérique pour aboutir à la formation de plus petites particules.

Du côté de l'étude de l'inhibition des interactions tanins-protéines, deux mécanismes possibles d'inhibition des interactions tanins-protéines ont été proposés. En effet Mateus *et al.* ont étudié l'impact de trois polysaccharides utilisés en œnologie (le xanthan, la gomme arabique, et la pectine) sur les interactions entre une protéine modèle, la BSA, et plusieurs tanins de degrés de polymérisations différents [144]. Cette étude leur a permis de démontrer

que la présence de ces polysaccharides limite la formation de complexes tanins-protéines insolubles pour l'ensemble des polyphénols testés, mais avec une efficacité décroissante avec le degré de polymérisation de ces tanins, et des mécanismes différents selon deux mécanismes possibles d'interaction (Figure 19).

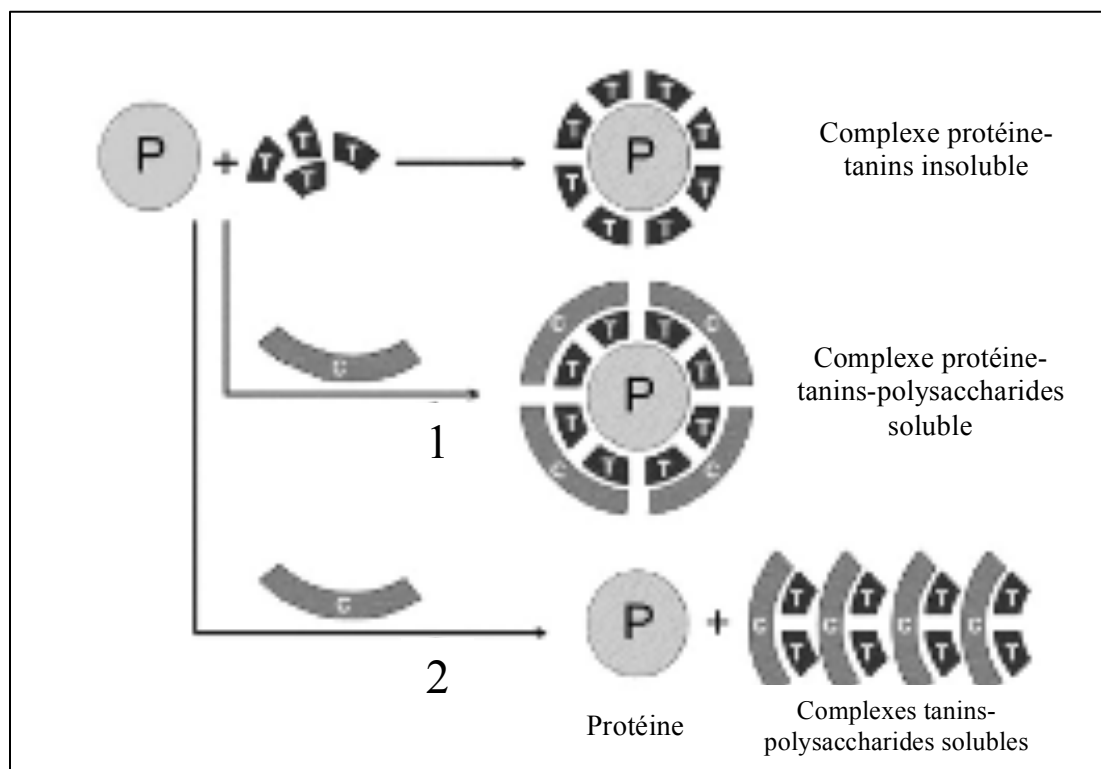


Figure 19 : Schéma d'interactions des polysaccharides avec des complexes tanins-protéines. Les polysaccharides (C) peuvent inhiber les interactions entre tanins (T) et protéines (P) selon deux mécanismes d'interactions possibles : avec formation d'un complexe tertiaire (1) ou par interaction avec les tanins entraînant la dissociation du complexe P-T (2). D'après Mateus et al. 2004 [144].

Dans un premier mécanisme, les polysaccharides chargés (poly-électrolytes) pourraient former des complexes tertiaires avec les agrégats tanins-protéines et favoriser ainsi la solubilité du complexe (cas de la pectine). Dans un système alternatif, les polysaccharides présenteraient une plus grande affinité pour les tanins et pourraient encapsuler ces derniers et ainsi dissocier les complexes tanins-protéines (cas du xanthan et de la gomme arabique).

Deux récentes études de Soares, sur l'Alpha amylase [145] et sur des extraits salivaires contenant de l' $\alpha$ -amylase, des mucines, des anhydrases carboniques, et de la lactoferrine [146] confirment par des études de DLS et par SDS-page l'existence de ces mécanismes.

D'autres études semblent en revanche favoriser un des deux systèmes. En effet d'un côté, des études montrent que lorsque la charge ionique des polysaccharides augmente, leur efficacité d'inhibition de l'agrégation tanins-protéines augmente également, favorisant ainsi le

premier mécanisme proposé [94]. Alors que d'un autre côté des études de Poncet Legrand *et al.* sur l'effet des MPs sur l'agrégation des tanins supportent plutôt le second système [143].

Une récente étude de 2011 de Gonçalves *et al.*, met cette fois-ci en évidence un effet de dissociation entre dimères de procyanidines (B3) et trypsine sous l'effet de la pectine [147]. Deux techniques complémentaires ont été utilisées par les auteurs : une analyse de RMN de différence de transfert de saturation (STD) permettant d'observer uniquement le signal du tanin fixé à la protéine (cf. chapitre III-C3) et un suivi d'extinction de fluorescence de la protéine préalablement marquée. Les résultats mettent en évidence une baisse du signal STD des tanins et une augmentation de la fluorescence de la protéine en présence de pectine mettant clairement en évidence une dissociation des complexes proanthocyanidines-protéine sous l'effet de la pectine, favorisant ainsi cette fois-ci le deuxième mécanisme d'interaction.

L'ensemble de ces études montre donc que l'effet des polysaccharides sur le comportement colloïdal des tanins et sur l'interaction tanins-protéines, semble être fonction du type et la structure des polysaccharides (monomère, dimère, chargé ou non, etc.). De plus, à l'heure actuelle même si l'effet inhibiteur de nombreux polysaccharides sur les interactions tanins-protéines semble mettre toute la communauté d'accord, les mécanismes aboutissant à cet effet restent discutés entre les deux systèmes proposés.

D'autre part, peu d'études moléculaires des interactions et des liaisons entrant en jeu et peu de mesures de leurs constantes d'affinités ont été réalisées. Mateus *et al.* proposent cependant la présence de liaisons hydrogènes entre les atomes d'oxygène des carbohydrates et le groupe hydroxyle des polyphénols, ainsi que des interactions de type hydrophobes.

### 3. Choix des sucres modèles

Il existe donc de nombreux sucres et polysaccharides présents dans le vin à des concentrations différentes et leur effet sur les interactions tanins-protéines semble pouvoir se faire selon deux schémas d'interactions différents.

Pour réaliser une étude cohérente et représentative de tous les effets possibles et des types de sucres majoritaires, il a donc fallu sélectionner des sucres modèles. Pour cela, nous avons décidé de nous focaliser sur deux sucres simples et deux polysaccharides.

Du côté des sucres simples, nous avons choisi le glucose pour représenter l'ensemble des hexoses présents dans le vin et le glycérol en rapport avec son pouvoir sucrant selon les œnologues (Figure 20).

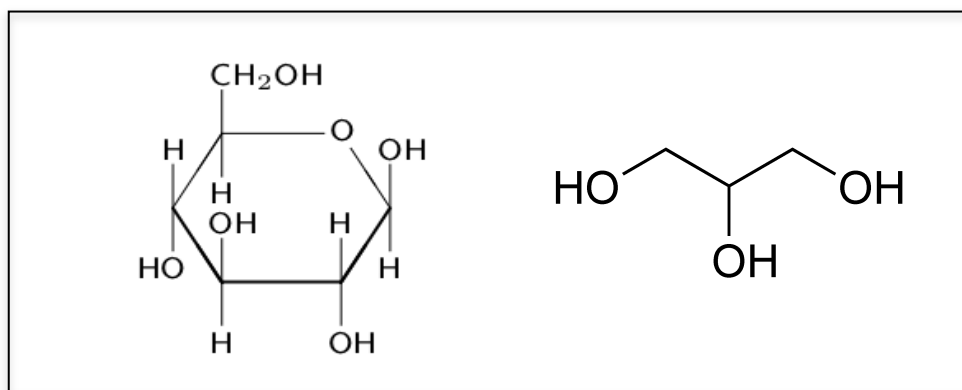


Figure 20 : Structures tridimensionnelles du glucose (à gauche) et du glycérol (à droite).

En ce qui concerne les polysaccharides, nous avons sélectionné la gomme arabique et la pectine (Figure 21). Ce choix a été guidé par deux éléments. D'une part l'origine de ces sucres, exogènes pour la gomme arabique car utilisée lors de la vinification en tant que stabilisateur de la matière colorante, et à la fois endogènes et exogènes pour la pectine qui est issue de la paroi pectique de la baie du raisin mais qui peut aussi être ajoutée au vin en tant que colloïde protecteur. D'autre part, ce choix nous semblait également judicieux de par leur mode d'interactions avec les complexes tanins-protéines, avec deux modes d'action mis en évidence dans la littérature : soit par formation d'un complexe tertiaire dans le cas de la pectine, soit par dissociation du complexe avec la gomme arabique qui rentre en compétition avec la protéine en se liant au tanin.

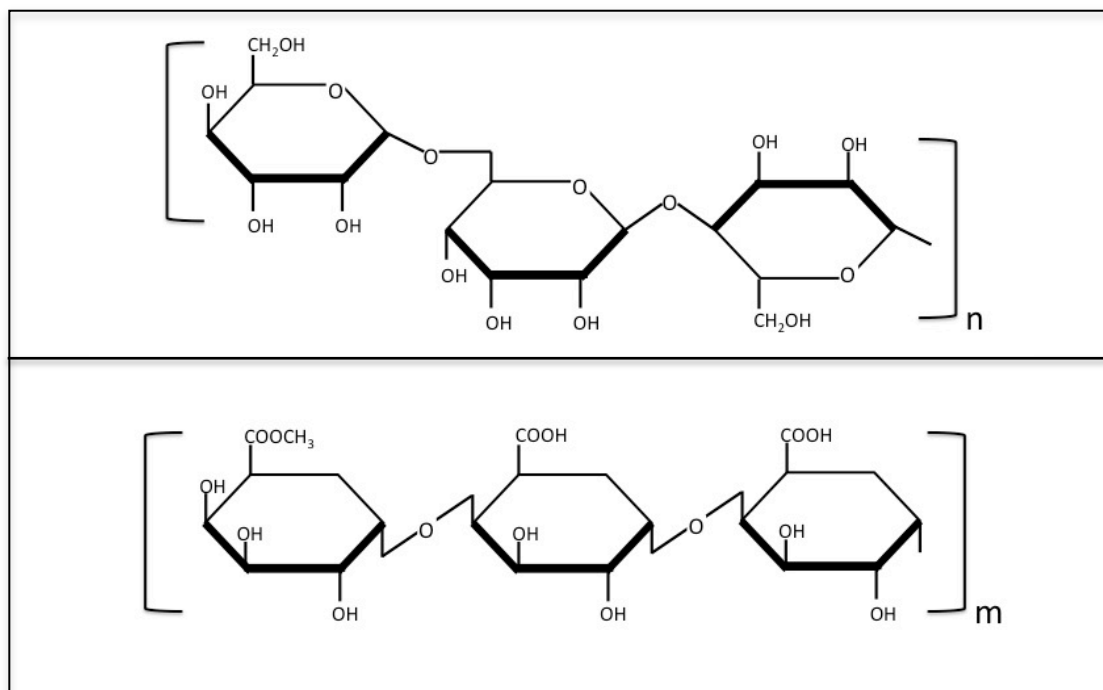


Figure 21 : Structures chimiques de la gomme arabique (en haut) et de la pectine (en bas).  
 $n$  moyen = 1350 et  $m$  moyen = 550.

## F- Objectifs et plan de la thèse

Cette thèse s'ancre donc dans la continuité de ces études, dans l'objectif de déterminer l'impact de la présence de sucres simples et polysaccharides sur les interactions tanins-protéines d'un point de vue moléculaire en utilisant principalement la Résonance Magnétique Nucléaire. L'utilisation de cette technique va nous permettre d'obtenir des données structurales et physico-chimiques sur la formation de complexes tanins-tanins ou tanins-protéines comme les constantes d'association ou de dissociation et les tailles des complexes formés.

Au cours de ce travail, nous avons étudié dans un premier temps l'influence des sucres sur le comportement colloïdal des tanins puis dans un deuxième temps sur des complexes tanins-protéines en utilisant deux types de protéines distinctes (un motif de 14 acides aminés et une protéine entière).

Pour réaliser cette étude un modèle d'étude tanin / protéine a donc été choisi. Il s'agit, comme nous l'avons justifié dans les parties précédentes, d'un complexe entre l'EGCG et un motif peptidique ou une PRP complète. La formation de ce complexe a été étudiée en présence de 4 sucres modèles, deux sucres simples (glucose et glycérol) et deux polysaccharides (gomme arabique et pectine).

Une première étape a donc été de mettre en place et d'optimiser la synthèse du peptide et de la protéine complète (Chapitre II).

Puis nous avons judicieusement choisi les méthodes d'analyses RMN afin d'obtenir les informations de structure et d'interactions que nous recherchions (Chapitre III).

Dans un premier temps, l'effet de ces sucres sur le comportement colloïdal de l'EGCG a été étudié (chapitre IV). Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'impact de ces différents sucres d'un point de vue de la structure et des interactions avec les tanins.

Une fois l'impact des sucres étudié sur les tanins, nous avons observé leur impact sur les interactions tanins-protéines (Chapitre V). Tout d'abord, l'étude avec le peptide IB9-14 nous a permis d'aboutir à un nouveau schéma d'interactions entre tanins et protéines qui sera discuté dans la suite de ce manuscrit. Ensuite, l'étude sur la protéine complète nous a permis de nous rapprocher au plus près des conditions naturelles d'interactions entre PRP et tanins. Cette étude nous a en effet permis, d'une part de confirmer le modèle d'interaction mis en évidence avec IB9-14 et d'autre part d'étudier l'impact de la longueur de la chaîne peptidique sur les interactions tanins-protéines. Ces études de l'impact de la longueur de la chaîne

peptidique pouvant être reliées à celles réalisées par Cala *et al* sur le peptide IB9-37 de 37 acides aminés et nous permettant ainsi d'obtenir des informations sur 3 tailles de peptides (14, 37 et 61 acides aminés).

Un bilan de l'ensemble des résultats (chapitre VI) et des perspectives pour la poursuite de cette étude conclura ce manuscrit.



**CHAPITRE II :**  
**SYNTHESE DES PEPTIDES ET DES**  
**DIMERES DE PROCYANIDINES**



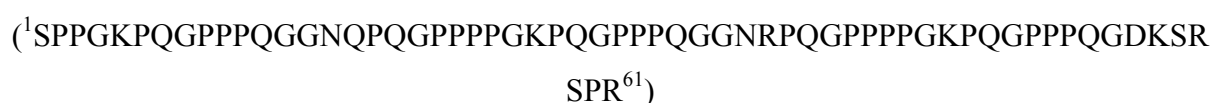
## A- Synthèse peptidique

Les synthèses du peptide IB9-14 et de la protéine IB9-61 (séquences primaires reprisent ci-dessous) ont été réalisées sur support solide [148], en utilisant une résine de type Wang et le groupement protecteur FastMoc, à l'aide d'un synthétiseur de peptides semi-automatique (Liberty Blue CEM) au sein du CBMN avec l'aide de C. Manigand.

IB7-14 :



IB9-61 :



### 1. Principe de la synthèse peptidique

Depuis Merrifield en 1963, la synthèse de peptide en phase solide (SPPS) a été largement développée et est de nos jours reconnue comme la méthode de synthèse de peptides la plus robuste, permettant l'obtention rapide de peptides plus longs. Cette technique se base sur deux méthodes de chimie de synthèse sur support solide, la chimie Boc ou la chimie Fmoc, la première nécessitant un milieu acide et la seconde un milieu basique, lors des déprotections. Pour nos protéines, nous avons choisi la méthode Fmoc, plus douce, et se réalisant en milieu basique.

Cette technique se caractérise par l'utilisation d'une résine jouant le rôle de support solide ayant pour propriété d'être inerte au solvant et aux réactifs utilisés pour la synthèse, tout en permettant une solvation optimale du peptide au cours de son élongation. Dans notre cas, cette résine est de type Wang. Elle est constituée de billes de polystyrène réticulé à 1% de divinyl-benzène et est préchargée avec le premier acide aminé du côté carboxy-terminal (C-ter) de la séquence à synthétiser. L'élongation se réalisant dans le sens C-ter vers l'extrémité amino-terminale (N-ter).

La réalisation de ces synthèses est aujourd'hui automatisée grâce à des synthétiseurs peptidiques, et depuis quelques années une nouvelle génération de synthétiseur peptidique à micro-ondes a permis d'améliorer considérablement la rapidité et le rendement des différentes réactions chimiques de synthèse.

### a. Stratégie de la synthèse

La synthèse d'un peptide est réalisée de manière linéaire, par fixation séquentielle de chaque acide aminé constituant la chaîne peptidique. Pour chaque fixation d'un résidu, une série de 4 étapes est nécessaire et présentée dans la figure 22 : la déprotection, l'activation, le couplage et le « capping ».

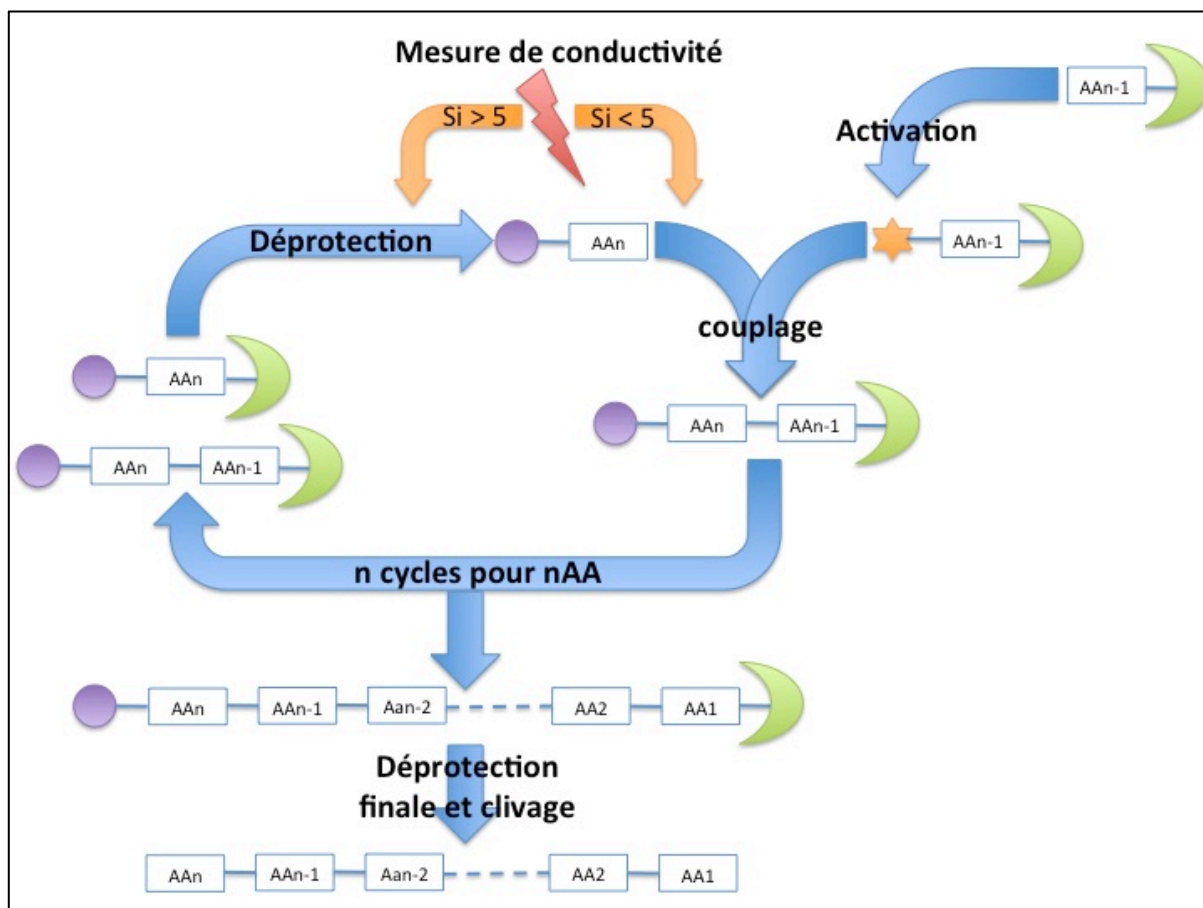


Figure 22 : Schéma de la technique de synthèse peptidique sur support solide. Chaque acide aminé est protégé par un groupement Fmoc schématisé (vert). L'acide aminé C-terminal est directement greffé sur la résine (violet). Après une étape de déprotection contrôlée par mesure de la conductivité, l'acide aminé n-1 est activé avant l'étape de couplage. Le peptide ainsi formé est renvoyé dans la boucle de synthèse jusqu'à obtention du peptide final qui subira une étape de clivage permettant de libérer le peptide de la résine.

L'étape de **déprotection** consiste à enlever le groupement protecteur Fmoc de l'acide aminé C-terminal (n) préchargé sur la résine pour libérer l'accès à sa fonction amine. Cette dernière pourra ainsi réagir avec le carbonyle activé de l'acide aminé suivant dans la séquence. Cette **déprotection** est assurée par une amine secondaire, la pipéridine.

Lors de cette étape, la pipéridine libre peut réagir avec un dibenzofulvène pour donner du dibenzofulvène-pipéridine quantifiable en UV à 301 nm, et des sels de carbamate sont également produits. Ces deux produits peuvent ainsi être mesurés respectivement par UV ou conductimétrie et permettent de mesurer l'efficacité de la déprotection. Ainsi, une nouvelle étape de déprotection est programmée jusqu'à ce que la différence entre deux mesures successives de conductivité après deux étapes de déprotection successives soit inférieure ou égale à 5%. Dans ce cas, on estime que la déprotection de toutes les amines a été réalisée (Figure 23).

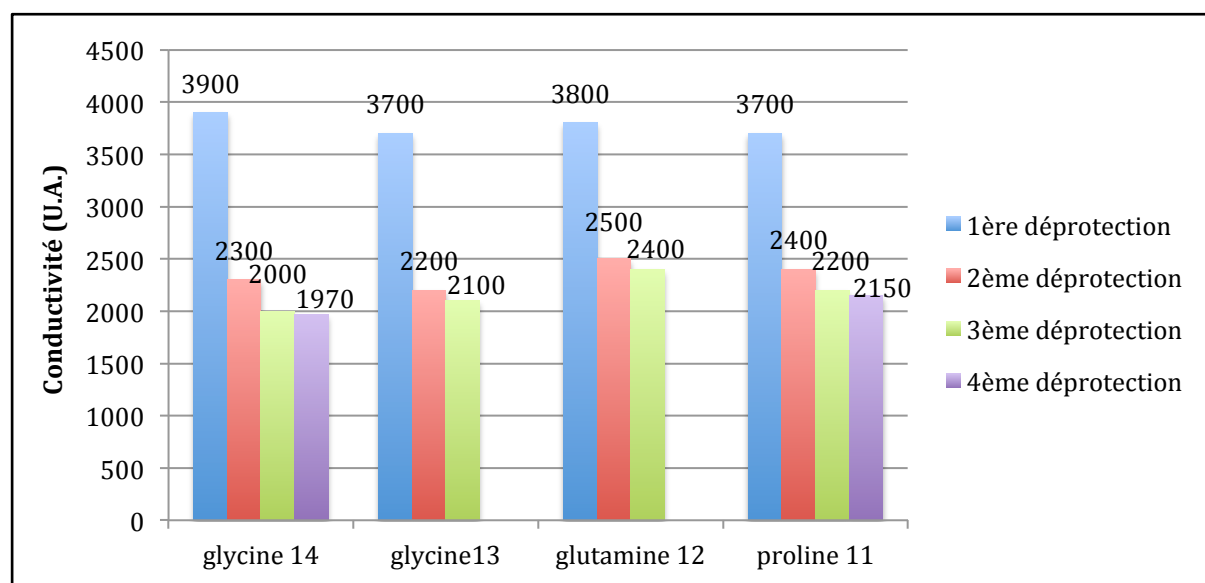


Figure 23 : Exemple de mesure de la conductivité pour contrôler la qualité de la déprotection lors de synthèse peptidique sur support solide du peptide IB9-14.

En effet dans l'exemple de la glycine 14, une première mesure de conductivité après la déprotection donne une valeur de 3900 U.A., après une deuxième déprotection cette valeur tombe à 2300. Nous avons donc une différence entre les deux déprotections de  $(3900-2300) / 3900 = 41\%$ , supérieur aux 5% programmé pour valider l'efficacité de la déprotection. Ainsi une troisième étape de déprotection est réalisée et après mesure de la conductivité, une différence de  $(2300-2000) / 3000 = 13\%$  est obtenue mais toujours supérieure aux 5% demandés. Finalement après la 4<sup>ème</sup> déprotection nous obtenons une différence entre la 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> de  $(2000-1970) / 2000 = 1,5\%$ . Cette valeur étant cette fois inférieure aux 5% demandés, la déprotection s'achève après cette 4<sup>ème</sup> déprotection.

L'étape de déprotection peut ainsi être plus ou moins longue en fonction de la nature de l'acide aminé à déprotéger comme lors de la déprotection de résidus arginine par exemple.

L'étape suivante, d'**activation**, permet de transformer la partie acide carboxylique de l'acide aminé n-1 en ester activé afin de permettre son couplage à l'acide aminé n déprotégé précédemment. Cette étape est assurée par l'action d'HBTU, d'HOBt et de la DIEA simultanément.

L'étape de **couplage** permet, quant à elle, de lier les deux acides aminés par une liaison amide. L'acide aminé n déprotégé est alors lié à l'acide aminé n-1 activé qui lui est toujours protégé par un groupement Fmoc. Pour optimiser le rendement de ce couplage, cette étape est réalisée deux fois. Un premier acide aminé n-1 est présenté à la résine avec un excès de 4 résidus libres pour une chaîne en élévation. Une fois le couplage terminé, la résine est lavée avec de la NMP puis incubée à nouveau avec le même acide aminé. Suite à ce double couplage, le rendement atteint est généralement de 98 à 99%.

La dernière étape est le « **capping** ». L'étape précédente de couplage n'étant pas totale avec un rendement d'environ 98 à 99%, même après un double couplage, certains acides aminés (n) ne fixent pas les acides aminés (n-1) libres, laissant une fonction amine active pouvant être fixée par le résidu suivant (n-2). Ce phénomène peut entraîner la formation de peptides délétés ou tronqués lors de la synthèse. Ainsi, l'étape de « capping » permet de s'affranchir de la synthèse de peptides délétés en bloquant les fonctions amines qui n'ont pas réagi. Cette étape est assurée par l'anhydride acétique.

### b. Isolement et Purification des peptides

Une fois la synthèse terminée, le peptide doit être isolé en le séparant de la résine et les groupements protecteurs des chaînes latérales doivent être clivés.

Une fois le clivage et la déprotection des peptides réalisés, il reste encore une étape de purification pour séparer le peptide des séquences tronquées ou délétées. Pour cela, une purification par chromatographie liquide haute performance HPLC est réalisée. Une ou plusieurs colonnes différentes ont parfois été nécessaires, avec des gradients de solvants d'élution et des durées de purification variables en fonction du peptide synthétisé. Ces détails seront apportés dans la partie suivante sur l'application à nos peptides.

### c. Contrôle de la pureté

Suite à la purification par HPLC, les peptides synthétisés sont ensuite contrôlés à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (ABSciex Voyager), ou ESI (ABSciex QSTAR) par l'équipe de la plateforme CESAMO (ISM).

Le cœur d'un spectromètre de masse est composé de 3 parties majeures : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. Il existe ainsi un grand nombre d'appareils qui diffèrent de par le type de ces 3 éléments (Figure 24).

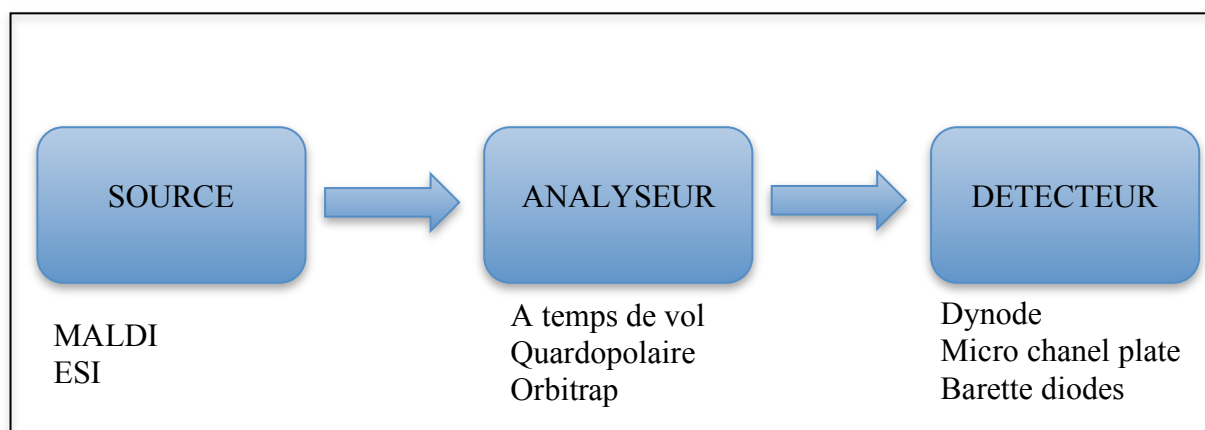


Figure 24 : Schéma structural d'un appareil de spectrométrie de masse.

Dans notre cas le MALDI- TOF et l'ESI que nous avons utilisés diffèrent principalement par la source d'ionisation employée.

En effet le MALDI se base sur une ionisation laser. Cette technique consiste à mélanger la solution issue de la chromatographie avec une matrice d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamique absorbant dans l'UV utile pour l'absorption Laser. Après évaporation complète des solvants l'échantillon « co-cristallise » avec la matrice. Il est ensuite introduit dans le spectromètre sous cette forme solide sous un vide de  $10^{-7}$  mbar et un laser UV est focalisé sur la matrice afin de désorber et ioniser l'échantillon (Figure 25 A). Ainsi l'impulsion laser en MALDI produit des clusters comprenant des molécules neutres de matrice (M), des ions de matrice  $(M+H)^+$ ,  $(M-H)^-$  et des molécules neutres d'échantillon (A) et l'analyte. Cette technique est cependant décrite comme pouvant être moins douce que les techniques d'électrospray et produire des fragmentations [149].

Dans le cas de l'ESI, la source d'ionisation utilisée est une technique par électronébulisation : l'ionisation se produit sur un échantillon en solution. Après passage de l'échantillon dans un capillaire métallique et évaporation du solvant, un spray formé de gouttelettes est produit en sortie de capillaire. Sous l'effet d'un gaz nébuliseur (par exemple N<sub>2</sub>) et d'un courant, les gouttelettes explosent (fission coulombienne) et des ions multichargés sont formés (Figure 25 B).

Une fois l'échantillon ionisé, l'application d'une différence de potentiel va permettre aux molécules formées d'être accélérées puis de voyager dans l'analyseur jusqu'au détecteur. Dans les deux techniques MALDI et ESI utilisées dans cette étude, un analyseur à temps de vol (TOF –Time Of Flight) a été utilisé. Ce détecteur s'appuie sur le fait que le temps mis pour atteindre le détecteur dépend du rapport masse/charge ( $m/z$ ) de l'ion analysé. Ainsi, après détection et analyse, nous avons donc accès au rapport masse sur charge, ce qui nous permet un suivi fin de la masse de tous les composés.

Cette technique offre un grand nombre d'avantages pour l'étude de peptides et de protéines avec une rapidité et une automatisation avec un haut débit d'analyses (plusieurs milliers d'analyses par jour), une bonne résolution lorsqu'elle est associée à un TOF ( $> 10000$  pour des peptides  $< 3000$  Da) et une très bonne sensibilité de quelques femtomoles.

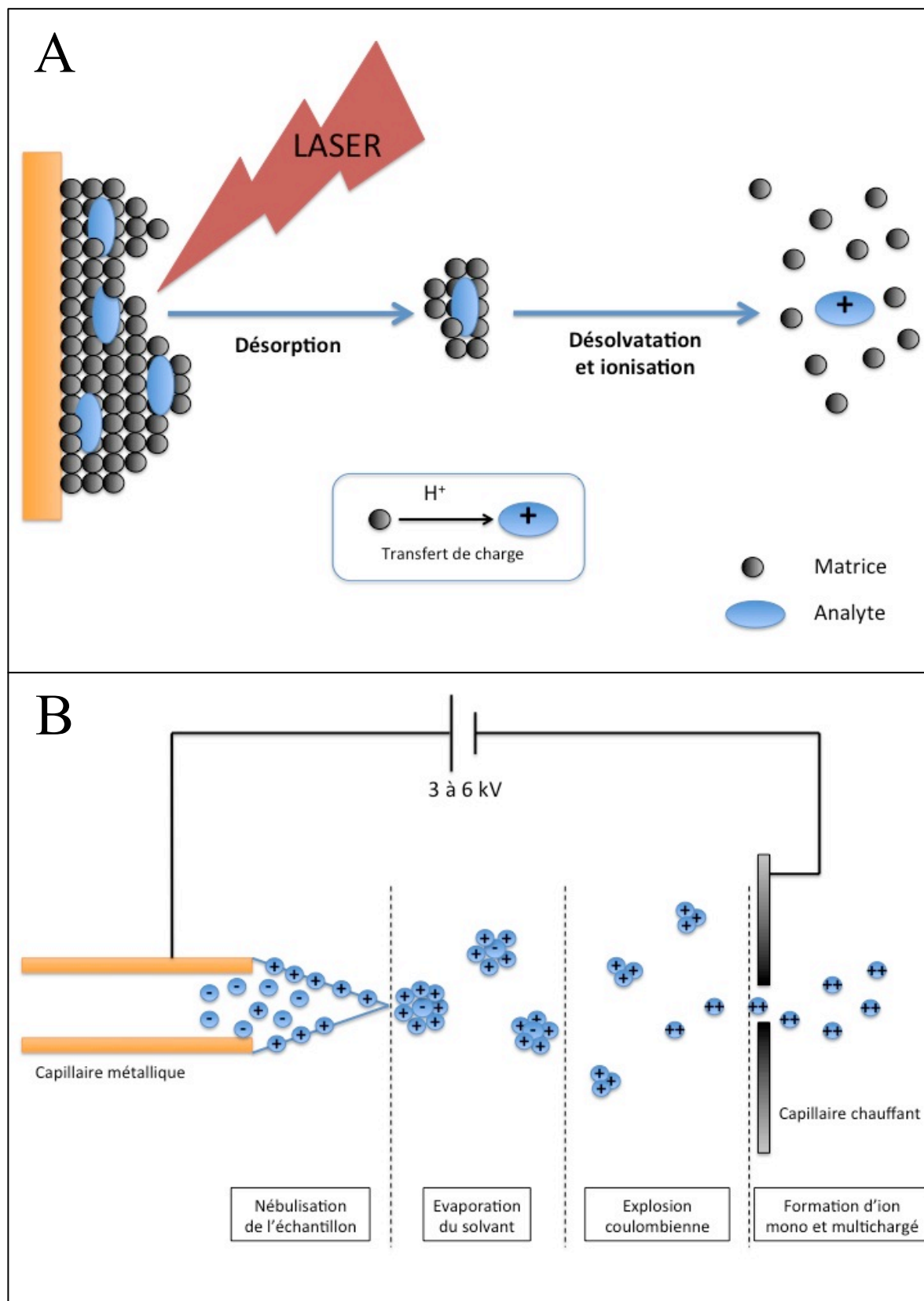


Figure 25 : Schéma des sources d'ionisation en spectrométrie de masse,  
A : Principe d'ionisation MALDI ; B : Principe d'ionisation ESI.

## 2. Application aux peptides modèles

### a. Peptide IB9-14

#### i. Synthèse et clivage

La synthèse du peptide IB9-14 a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur peptidique à micro ondes Liberty Blue (CEM  $\mu$ Waves S.A.S., Orsay France) à l'aide d'une méthode de chimie de type FastMoc. La résine, les acides aminés-Fmoc, protégés au niveau des groupements latéraux, ainsi que HOBt et HBTU proviennent de la compagnie Novabiochem (Läufelfingen, Switzerland) et les solvants de SDS (Peypin, France).

Les solvants et réactifs sont délivrés au synthétiseur sous pression. La composition des bouteilles est détaillée ci-dessous :

- Bouteille de déprotection : 20% de pipéridine dans du NMP
- Bouteille de capping : anhydride acétique/DIEA/HOBt (19 mL/9 mL/0,8 g, v/v/v) dans 400 mL de NMP
- Bouteille d'activation : HBTU/HOBt (37,9 g/13,6 g) dans 200 mL de DMF
- Bouteille d'activation et couplage : 35% de DIEA dans NMP
- Bouteilles de lavage : DCM et NMP respectivement.

Pour débiter la synthèse, 0,25 mmol de résine Wang préchargée avec une glycine sont utilisés. Les acides aminés libres sont ensuite présentés avec un excès de 10% par rapport à la résine.

Les différentes étapes de la synthèse (cf. chapitre II-1 a.) sont pilotées à l'aide du logiciel intégré du Liberty Blue et une technique avec double couplage conditionnel est choisie. Le double couplage est un module conditionnel du programme de gestion de l'automate. Il dépend de la fixation précédente, dont le bon déroulement est suivi par la mesure en temps réel de la conductivité, comme présenté figure 22. Le second couplage n'est ainsi effectué que dans les cas où la dernière déprotection observée n'est pas conforme aux restrictions demandées pour la déprotection (différence de conductivité entre 2 déprotections successives inférieure à 5%) (Figure 23).

A la fin de l'élongation, le peptide fixé à son support solide, est récupéré afin d'être déprotégé et séparé de son support. Cette étape consiste en un clivage chimique en milieu acide permettant la séparation du peptide de la résine tout en déprotégeant simultanément les chaînes latérales.



Pour cela, la résine couplée au peptide est tout d'abord pesée puis lavée par trois cycles de deux solutions : méthanol puis dichlorométhane. A chaque cycle le couple résine-peptide est filtré au travers d'un fritté de porosité 4.

La résine est ensuite dissoute dans une solution composée de TFA/phénol/H<sub>2</sub>O/TIPS (88/5/5/2), avec 10 mL pour environ 0,8 g de peptide-résine, sous agitation magnétique durant 2 heures. Au cours du clivage, la solution de résine change de couleur et devient jaune. Le mélange obtenu composé de la résine seule et du peptide néo-synthétisé est ensuite lavé au TFA et DCM puis filtré. Ces deux solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite et le brut de synthèse est récupéré par une extraction au diéthyldéther froid (-20°) /H<sub>2</sub>O (10/10, v/v). Le peptide IB9-14 étant soluble dans l'eau, seuls les réactants du clivage se retrouvent dans la phase étherée et cela permet une première élimination grossière des groupements protecteurs. La phase aqueuse contenant le peptide est alors lyophilisée pour conservation.

## ii. Purification et contrôle de la pureté

Une fois le brut de synthèse récupéré, ce dernier a été purifié par HPLC à l'aide d'un appareil Water 2487 avec un détecteur d'absorbance à double longueur d'onde (214 et 254 nm) en utilisant une colonne à phase inverse Nova Pak C18 (Alliance chromatographic system, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). La phase stationnaire est une colonne analytique greffée de chaînes aliphatiques de 18 carbones (15 µm, 100 Å, 7,8 x 300 mm).

L'élution est réalisée avec un débit de 1 mL/min en utilisant un gradient variant de 100% d'un mélange A : H<sub>2</sub>O et 0,1% TFA à 100% d'un mélange B : Acétonitrile et 0,08% TFA. La présence du peptide, est caractérisée par suivi de la densité optique à 214 nm, spécifique de la liaison peptidique des résidus amino acides constituant la chaîne protéique. Le suivi de l'absorption à 254 nm caractéristique des groupements aromatiques est également utilisé comme contrôle. Or le peptide n'en possède pas, la variation de cette valeur va pouvoir nous informer sur la présence d'impuretés dans la solution, comme certains groupements protecteurs. Le peptide est élué à 11 min, de manière reproductible pour chaque injection (Figure 27).

La pureté a ensuite été contrôlée par spectrométrie MALDI-TOF (Figure 26) à l'aide d'un appareil ABSciex Voyager (Applied Biosystems) équipé d'un laser N<sub>2</sub> à 337 nm. Les spectres sont enregistrés en mode ion positif en utilisant un miroir reflectron avec une accélération à un voltage de 20 kV.

L'échantillon est dissous en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à 10 mg/mL et la matrice  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CAS [28166-41-8]) utilisée, est préparée par dissolution de 10 mg dans 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Une dernière solution d'agents cationiques (NaI, 10 mg/mL) est également préparée avec du MeOH.

Ces 3 solutions sont ensuite combinées à un ratio volumique 10:1:1 de matrice, échantillon, et agent cationique, puis 1 à 2  $\mu\text{L}$  de la solution obtenue sont déposés sur la cible puis séchés à vide.

### iii. Résultats

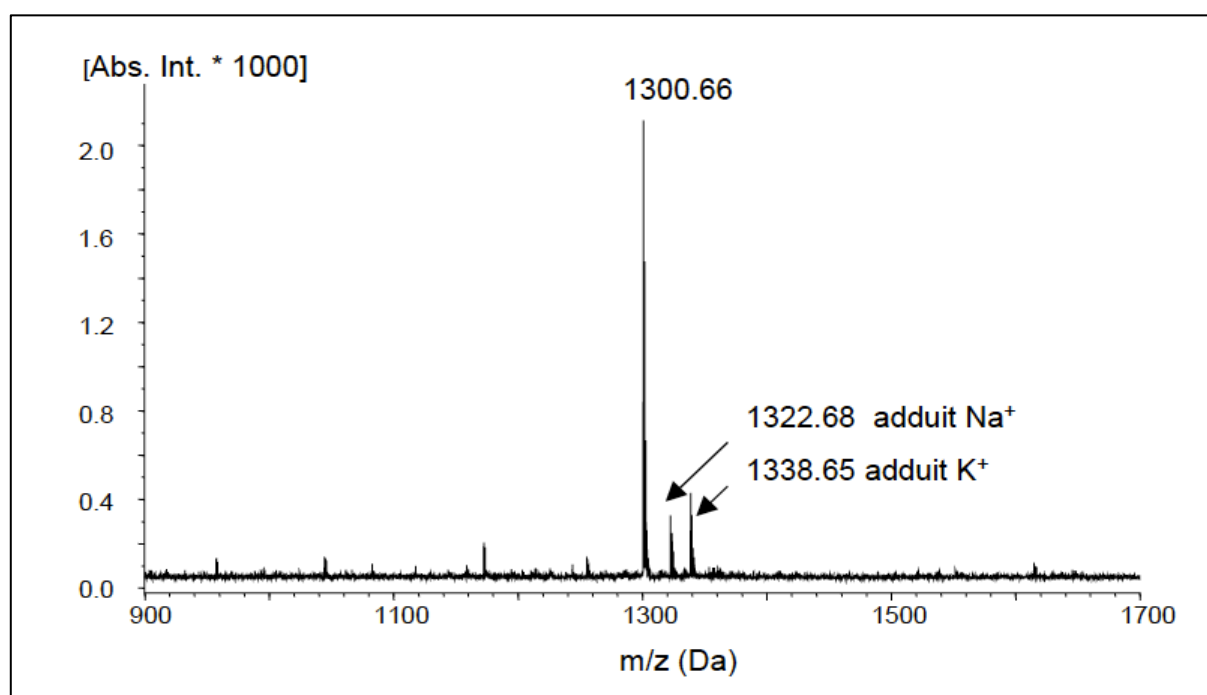


Figure 26 : Spectres de masse en MALDI-TOF du brut de synthèse du peptide IB9-14 dont le pic majoritaire de 1300,66 Da correspond au peptide IB714 monoisotopique ( $M+H$ ). La présence d'autres pics traduit l'impureté de la solution.

Le spectre de masse effectué en MALDI-TOF sur le brut de synthèse d'IB9-14 (Figure 26) montre la présence d'un pic majoritaire pour un rapport masse/charge ( $m/z$ ) de 1300,66. Ce pic correspond au peptide IB9-14 de masse mono isotopique de 1300,66 soit de masse exacte 1299,66  $\text{g.mol}^{-1}$ . La présence largement dominante de ce pic montre ainsi que la synthèse a été réalisée avec un très bon rendement. Les autres pics d'intensité plus faible correspondent à des impuretés présentes dans l'échantillon et ont été éliminées par HPLC en phase inverse.

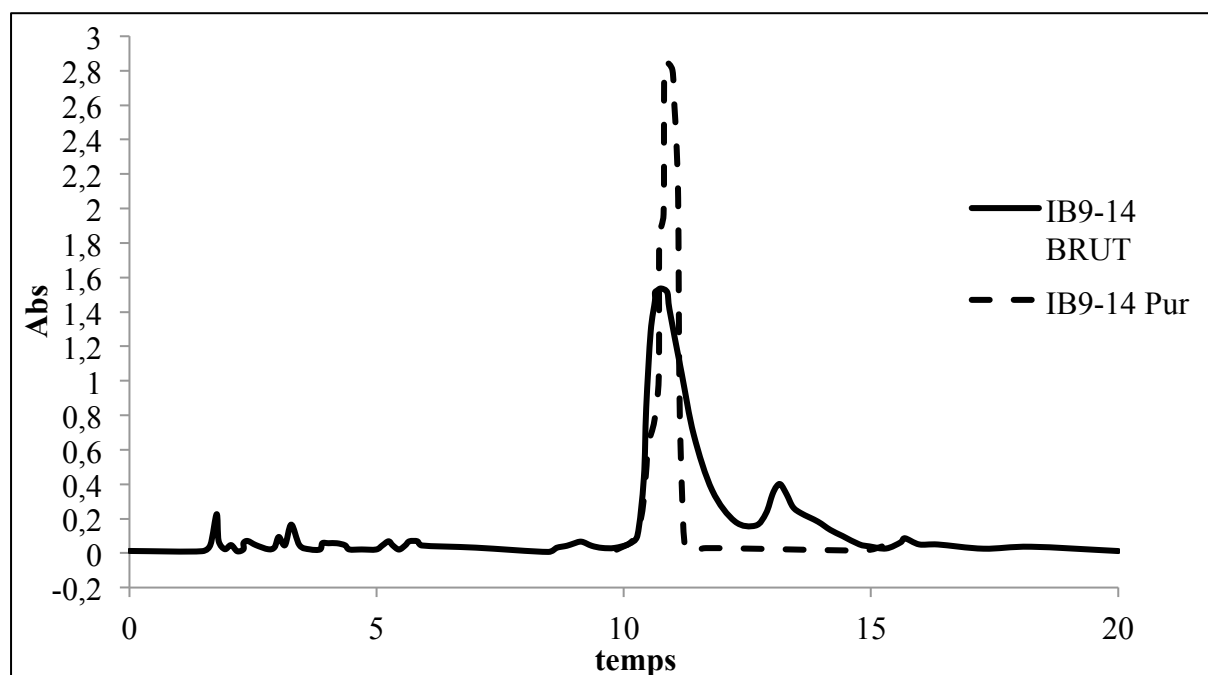


Figure 27 : Chromatogrammes obtenus après synthèse du peptide IB9-14 par HPLC en phase inverse, équipée d'une colonne C18, sous un gradient linéaire H<sub>2</sub>O/Acétonitrile (de 100/0 à 0/100) sur 40 min délivré avec un débit de 1 mL/min. Le chromatogramme en trait plein représente le brut, celui en pointillé le chromatogramme du peptide purifié.

Les chromatogrammes HPLC (Figure 27) obtenus avant (en trait plein) et après (en pointillé) la purification, nous permettent de mettre en évidence l'efficacité de notre purification. En effet, sur le brut de synthèse, plusieurs pics sont visibles en plus de notre pic d'intérêt majoritaire. Les pics élués au premier temps (1 à 8 min) correspondent au groupement protecteur et le pic étalé entre 12 et 14,5 min met en évidence un mélange de plusieurs produits peptidiques ayant une composition de nature très proche.

En revanche après fractionnement et récupération de notre pic d'intérêt, seul celui représentatif du peptide IB9-14 reste présent en solution sur le chromatogramme après purification. Ainsi, la pureté de la fraction peptidique apparaît nettement sur le spectre car seul le pic correspondant au temps d'élution du peptide (~11 min) est présent.

A l'issu de cette chromatographie, le succès de la purification est confirmé par spectrométrie de masse dont le spectre ne contient plus que la masse du peptide avec ou sans adduits de sels.

Le rendement obtenu pour cette synthèse est de 56% après purification, ce qui fait un taux de greffage par acide aminé de  $\sqrt[13]{56}$  ; soit 97%. Cette valeur est proche du rendement théorique maximal proposé par la technique qui est de 98%.

De cette manière, 35 mg de peptide IB9-14 pur ont été synthétisés.

## b. Protéine IB9-61

### i. Synthèse et clivage

La production d'une protéine de 61 acides aminés reste un challenge de part la limitation de cette technique de synthèse linéaire sur support solide habituellement donnée aux alentours de 55 acides aminés.

La synthèse du peptide IB9-14, représentant la partie amino-terminale de la protéine IB9, ne nécessitait pas de précautions particulières car sa taille la rend relativement facile à synthétiser. A contrario, pour arriver à son terme avec un rendement correct, la synthèse de la protéine entière IB9 requiert l'apport de quelques modifications dans le procédé de synthèse.

Cette synthèse de 61 acides aminés nécessite de part sa taille un temps important, environ 15 jours sur un synthétiseur classique Applied Biosystem Peptide Synthesizer 433A (PE Biosystem, Courtaboeuf, France). Ainsi l'utilisation de notre synthétiseur à micro ondes CEM liberty Blue (CEM  $\mu$ Waves S.A.S., Orsay, France) pour réaliser cette synthèse s'est avéré d'un grand intérêt à la fois du point de vue du gain de temps (seulement 4 à 5 jours) et d'une économie de solvant.

Tout comme pour le peptide de 14 acides aminés, la résine, les acides aminés-Fmoc, protégés au niveau des groupements latéraux, ainsi que HOBt et HBTU proviennent de la compagnie Novabiochem (Läufelfingen, Switzerland) et les solvants de SDS (Peypin, France).

La méthode choisie pour cette synthèse d'IB9-61 a été la technique FastMoc à 0,25 mmol d'arginine prégreffé sur la résine, avec un excès d'un facteur 4 en acides aminés libres.

La résine utilisée est une résine NovaSyn® préchargée avec de l'arginine, que nous avons préférée à la résine Wang, reliée au premier acide aminé par un groupement HMP. En effet, le taux de substitution de cette résine NovaSyn® est bien moins élevé (entre 0,1 et 0,3 mmol.g<sup>-1</sup> de résine) ce qui la rend plus adaptée à l'élongation de longues chaînes peptidiques. De plus cette résine est dotée d'un polyéthylèneglycol qui constitue un bras espaceur empêchant un retour de l' $\alpha$ -amine sur la résine permettant d'améliorer le rendement.

Au démarrage de la synthèse, une solvation de la résine deux fois plus longue que pour le peptide de 14 acides aminés a été réalisé par deux passages successifs de DCM ainsi que de NMP, dans le but de permettre à la résine de gonfler et de s'hydrater au mieux, afin d'obtenir un rendement le plus important possible. Et cette fois, le double couplage a été rendu obligatoire pour l'ensemble des acides aminés de la synthèse.

La constitution des solvants reste quant à elle la même que pour la synthèse d'IB9-14 (cf. chapitre II-2 a.i.).

Une fois l'élongation terminée, la protéine IB9 fixée au support est récupérée afin de subir un traitement acide dans le but de récupérer la protéine libérée de la résine, comportant des chaînes latérales fonctionnelles, sans groupements protecteurs. Pour cela une étape de clivage quasi identique à celle utilisée pour IB9-14 est mise en œuvre. La résine est dissoute dans une solution composée de TFA/phénol/H<sub>2</sub>O/TIPS (88/5/5/2), mais avec cette fois-ci 20 mL pour environ 1 g de peptide-résine, sous agitation magnétique durant seulement 1,5 h. En effet, cette réaction clivante doit être la plus courte possible pour minimiser le contact du peptide néo-synthétisé avec les réactifs de clivage. Une action prolongée de la mixture de clivage pourrait produire des groupements PEG gênant les étapes de purifications suivantes.

Finalement, le mélange obtenu composé de la résine seule et du peptide néo-synthétisé est ensuite lavé au TFA et DCM puis filtré. Les solvants sont ensuite évaporés sous pression réduite et le brut de synthèse est récupéré par extraction au diéthyléther froid (-20°) /H<sub>2</sub>O (10/10, v/v). La phase aqueuse contenant le peptide est alors lyophilisée pour conservation.

## ii. Purification et contrôle de la pureté

Une fois la protéine obtenue, elle a été purifiée par deux HPLC successives sur un appareil Waters 2487 avec un détecteur d'absorbance à double longueur d'onde (214 et 254 nm).

Une colonne échangeuse d'ions a tout d'abord été utilisée. Une fois la fraction d'intérêt récoltée, elle a ensuite été dessalée sur une colonne à phase inverse Nova Pak C18 (Alliance chromatographic system, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) identique à celle utilisée pour le peptide IB9-14.

Pour la première étape de passage dans la colonne d'échange ionique, un débit de 3 mL/min a été utilisé avec un gradient variant de 100% d'un mélange A Tris/HCl à 20 mM à 75% de A et 25% d'un mélange B composé de A + 0,5 M de NaCl. Le peptide est ainsi élué en solvant salé entre 32 et 40 min.

Dans une deuxième étape, la fraction d'intérêt ainsi récupérée est dessalée sur la colonne C18 avec un débit de 3 mL/min en utilisant un gradient variant de 88% à 80% d'un mélange A : H<sub>2</sub>O et 0,1 % TFA, et d'un mélange B : Acétonitrile et 0,08 % TFA. Le peptide est cette fois élué à 18 min, de manière reproductible pour chaque injection.

Dans les deux cas, la présence du peptide est comme pour IB9-14 caractérisée par suivi de la densité optique à 214 nm et 254 nm (cf. chapitre II-2 a.ii.).

Une technique de dessalage par injection manuelle sur des colonnes HiTrap d'exclusion de taille a également été testée mais ne permettait pas un dessalage suffisant pour une utilisation de la protéine en RMN et en spectrométrie de masse.

Après purification la protéine a été contrôlée par spectrométrie MALDI-TOF et ESI.

L'analyse par MALDI a été mise en œuvre avec le même protocole que pour le peptide de 14 acides aminés (cf. chapitre II-2 a.ii.).

L'analyse ESI a été réalisée sur un appareil ABSciex QSTAR (Applied Biosystems), équipé d'une source ESI. Les spectres sont enregistrés en mode négatif/positif. L'aiguille de l'electrospray est maintenue à 4500 V à température ambiante et l'échantillon est introduit par injection de 20  $\mu$ L avec un flux de 400  $\mu$ L/min de méthanol.

### iii. Résultats

Le spectre de masse en MALDI-TOF du brut de synthèse de la protéine IB9-61 (Figure 28) présente le pic d'intérêt correspondant à la protéine pour un rapport masse/charge ( $m/z$ ) de 6023 Da. Ce spectre met également en évidence un autre pic majoritaire à 3012 Da correspondant à la moitié de notre protéine, il s'agit d'une fragmentation générée par la ionisation de type MALDI.

De plus, un pic à 6005 Da correspondant à notre peptide déléte d'une molécule d'eau est également mis en évidence sur le spectre. Ce pic pouvant être soit une autre fragmentation avec perte d'une molécule d'eau lié à la source MALDI soit une délétion ayant lieu durant la synthèse, une technique de spectrométrie ESI plus douce que le MALDI a été employée.

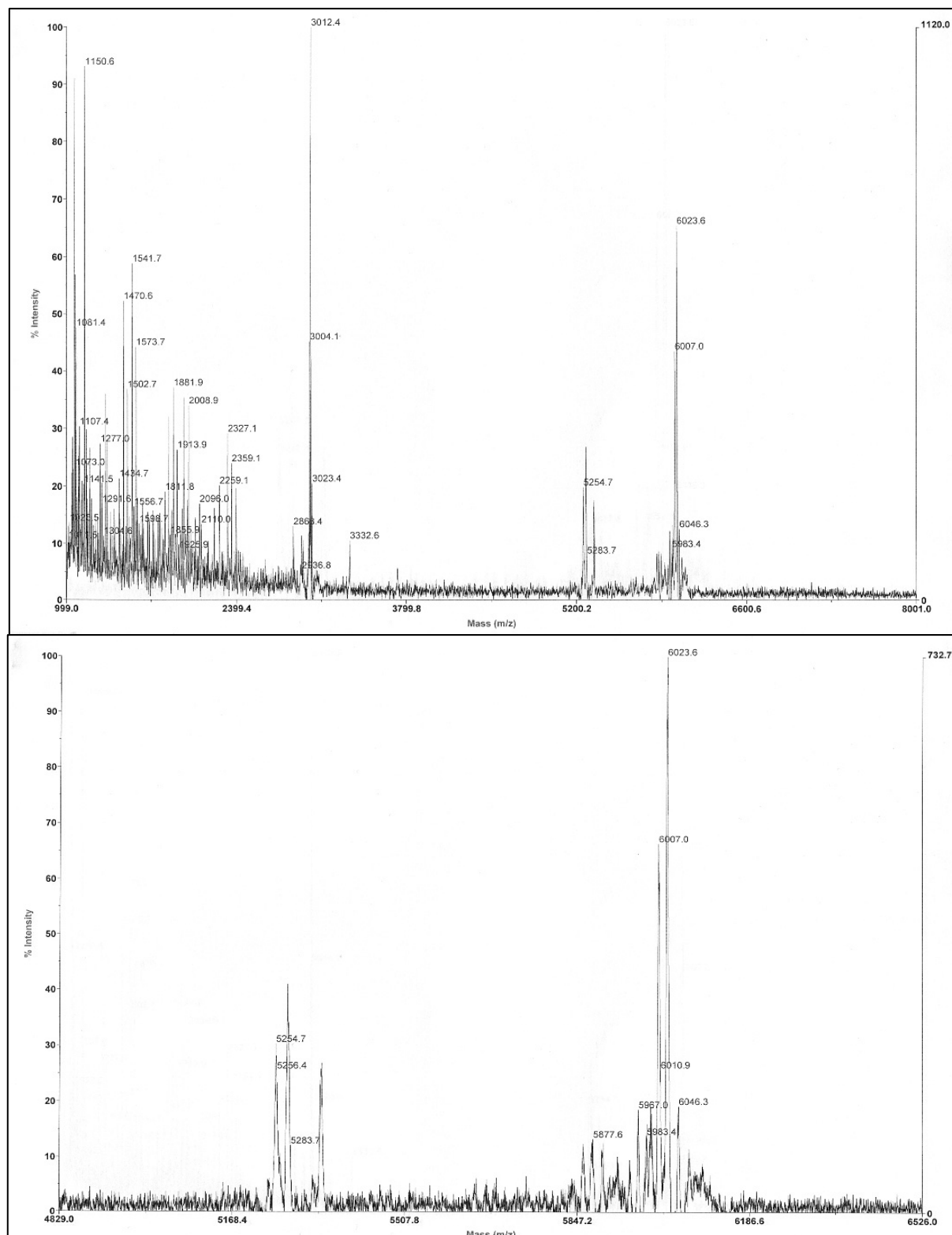


Figure 28 : Spectre de masse MALDI de la protéine IB9-61 brut de synthèse. Le pic moléculaire de la protéine apparaît à  $m/z = 6023,7$  Da, un pic correspondant à la perte de la masse d'une molécule d' $H_2O$  (18 Da) apparaît à 6005,5 Da.

Sur le spectre ESI de la protéine IB9-61 pure (Figure 29), seul les pics d'intérêts de la protéine apparaissent avec leurs différents niveaux de charge et le pic déléte d'une molécule d'eau n'est plus présent. Cela confirme donc l'efficacité de la purification et le fait que le pic à -18 en m/z était bien lié à l'ionisation de type MALDI. En effet l'ionisation laser en MALDI couplée à la matrice utilisée peut parfois produire ce genre d'artefact en ionisant une molécule d'eau du peptide.

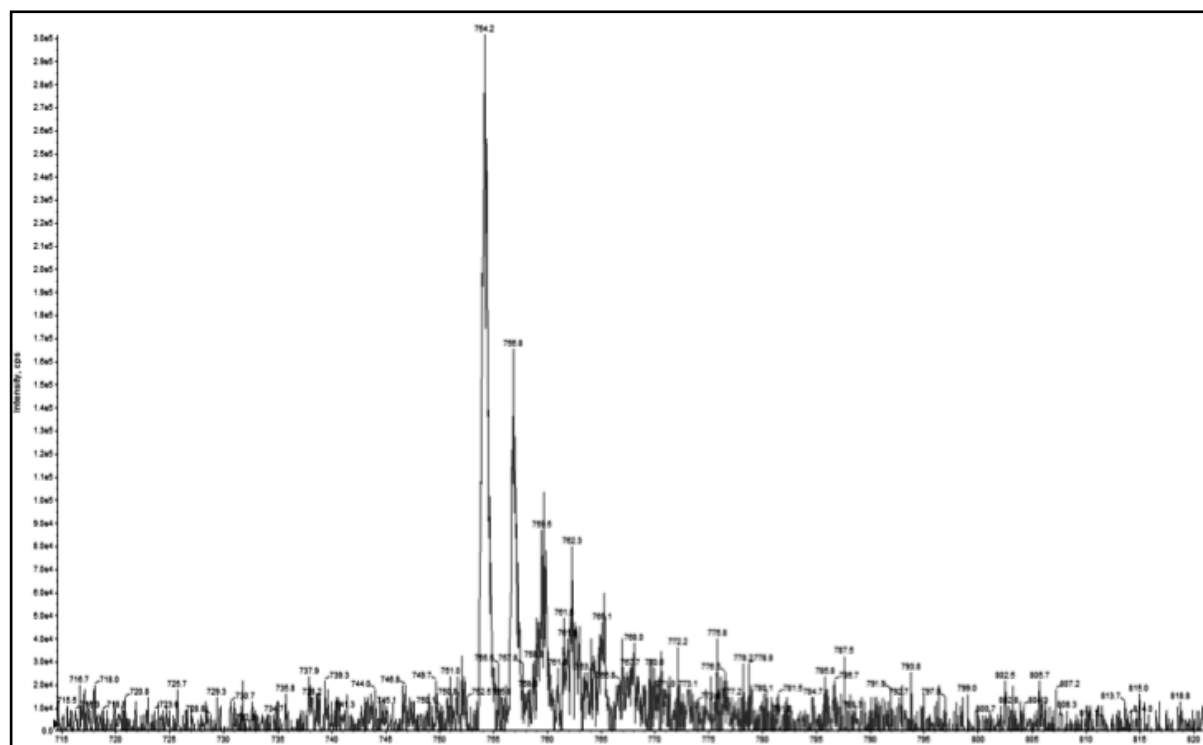


Figure 29 : Spectre de masse ESI de la protéine IB9-61 après purification. L'ensemble des masses visibles correspond à notre protéine avec différents degrés de charge.

Après purification 15 mg de protéine ont pu être récupérés.

### c. Conclusion sur l'obtention des peptides

Après optimisation des conditions de synthèse peptidique sur support solide, les synthèses d'IB9-14 et IB9-61 ont pu être réalisées avec des rendements tout à fait acceptables, avec des taux de greffage par résidu de 97 et 95%. Les difficultés inhérentes à la composition des PRPs, riches en résidus prolines et glycines ont ainsi pu être contournées.

L'obtention de quantités suffisantes d'IB9-14 et IB9-61 a ainsi permis de réaliser leur étude structurale ainsi que l'étude des interactions tanins-protéines (cf. chapitre V).



## B-Synthèse de dimères de procyanidines

Les différents tanins utilisés au cours de cette thèse ont été majoritairement produits au Portugal au sein du laboratoire du professeur V. De Freitas, à l'université de Porto, lors de deux stages de 3 semaines en octobre 2011 et 2012, dans le cadre d'un programme d'échange (EGIDE). Deux techniques de production de tanins ont été utilisées, une méthode de synthèse et une méthode d'extraction.

### 1. Synthèse des dimères B3, B6 et de trimères

La réduction de la (+)-taxifoline avec le tétrahydroborure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) se fait rapidement avec formation du flavan-3,4-diol et d'un dégagement d'hydrogène (Figure 30) [150]. En plus d'être un réducteur puissant, le  $\text{NaBH}_4$  est également une base forte rendant le milieu réactionnel fortement basique. Pour cette raison, il est nécessaire de réaliser la synthèse sous atmosphère inerte (flux d'argon) afin d'éviter l'oxydation des composés phénoliques. Une acidification rapide du milieu ( $\text{pH}=4$ ), produit la formation de carbocation  $\text{C4}^+$  à partir du flavan-3,4-diol. Lors de l'ajout de la (+)-catéchine, le carbone C8 est le site préférentiel d'une attaque nucléophile par rapport au carbone C6. Cette régiosélectivité est liée aux facteurs stériques apportés par les groupes hydroxyles du noyau phloroglucinol. De plus la formation de liaison interflavane est stéréospécifique. Elle est conditionnée par la stéréochimie (2R,3S)-2,3-trans de l'électrophile. Dans les conditions de cette synthèse, la formation des isomères 3,4-trans est favorisée [151].

La réaction est réalisée avec des quantités stoechiométriques de (+)-taxifoline et (+)-catéchine et produit essentiellement les dimères de procyanidines C4-C8 (B3) ainsi que les dimères C4-C6 (B6) et des trimères en plus faible quantité. Comme observé sur la figure 30, présentant la synthèse réalisée avec deux rapports molaires (+)-taxifoline/(+)-catéchine différents (1/3 et 1/1,5), le fait de se rapprocher d'un rapport stoechiométrique 1/1 favorise la formation du dimère B6 en ne baissant que légèrement la concentration finale en B3. Lors de cette synthèse les dimères produits réagissent également pour former différents trimères (Figure 30).

Ainsi, à la fin de la synthèse, nous obtenons un mélange de dimères B3, B6 et de différents trimères avec un ratio 50 :15 :35 [152].

Après récupération du milieu réactionnel, filtration sur gel C18, et récupération en méthanol, ce dernier est purifié sur une colonne Toyopearl de 30 cm à l'aide de méthanol avec un flux de 0,8 mL/min.

De cette manière, 6 fractions peuvent être récupérées en environ 8h permettant d'isoler les deux dimères B3, B6 et un mélange de trimères.

Le rendement d'obtention du B6 est de 14% et B3 de 49%.

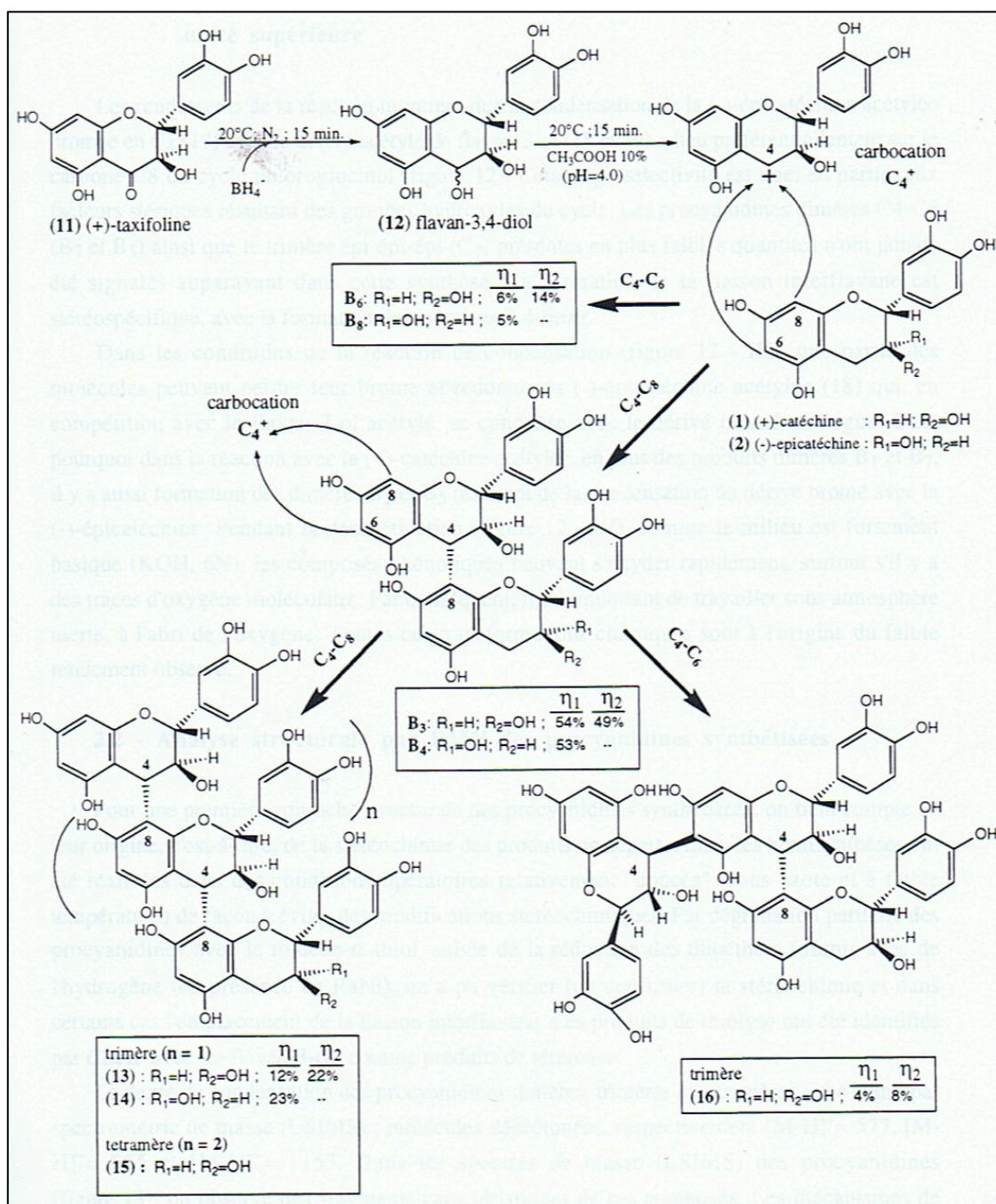


Figure 30 : Synthèse des procyanidines à partir de la (+)-taxifoline (rendement  $\eta_1\eta_2$ , pour des rapports molaires (+)-taxifoline/flavan-3-ol ; 1/3 et 1/1,5 respectivement). D'après V. De Freitas 1995 [150].

## 2. Extraction de dimères de procyanidines

Une autre technique consiste à extraire et isoler les tanins condensés présents dans la peau des grappes de raisins. Pour cela, une extraction à partir de tissu végétal de *Vitis vinifera* a été réalisée avec une solution éthanol/eau/chloroforme (1 :1 :2, v/v/v). Après élimination de la phase avec le chloroforme contenant la chlorophylle et les lipides, la phase hydro-alcoolique est extraite à l'acétate d'éthyle. Le solvant organique est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif à 30°C afin d'obtenir un résidu contenant des catéchines monomères et des procyanidines oligomériques [77].

Pour séparer les différentes procyanidines, 2 g de ce résidu est ensuite chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité (gel Toyopearl compacté à 10 cm). Les chromatogrammes sont enregistrés à 280 nm à l'aide d'un détecteur UV. L'élution est ensuite réalisée en 100% méthanol, pour les premières fractions contenant les procyanidines à faible poids moléculaire, puis en méthanol avec 5% et 10% d'acide acétiques pour les fractions contenant les procyanidines à plus fort poids moléculaire (Tableau 2).

Numéro de la Fraction	Temps d'élution	Solvant
<b>Fraction 1</b>	30	MeOH
<b>Fraction 2</b>	15min	MeOH
<b>Fraction 3</b>	15min	MeOH
<b>Fraction 4</b>	4h	MeOH
<b>Fraction 5</b>	14h	MeOH/5% acide acétique
<b>Fraction 6</b>	8h	MeOH/10% acide acétique

*Tableau 2 : Temps d'élution des différentes fractions de procyanidines d'un extrait hydroalcoolique de Vitis Vinifera.*

Cette séparation permet d'isoler et récupérer, de la catéchine (Fraction 1), de l'epicatéchine gallate (Fraction 2), ainsi que des dimères comme B3, B6 (Fraction 3) et B2-gallate (Fraction 4). En se focalisant sur les fractions contenant le B2-gallate, nous avons pu récupérer 20 mg de produit.

## 3. Conclusion sur l'obtention des dimères de procyanidines

L'utilisation de ces deux techniques de synthèse et extraction nous a ainsi permis de produire des dimères B3, B6 en quantité suffisante pour réaliser à la fois leur caractérisation par RMN et leur interaction avec la PRP complète IB9-61. L'interaction du dimère B3 avec la protéine IB9-61 sera présentée dans le chapitre V.

Les caractérisations par RMN des différents dimères sont présentées ci dessous :  
Il faut noter que le dimère B6 présente deux rotamères dans les proportions 48/52 (Figure 31).

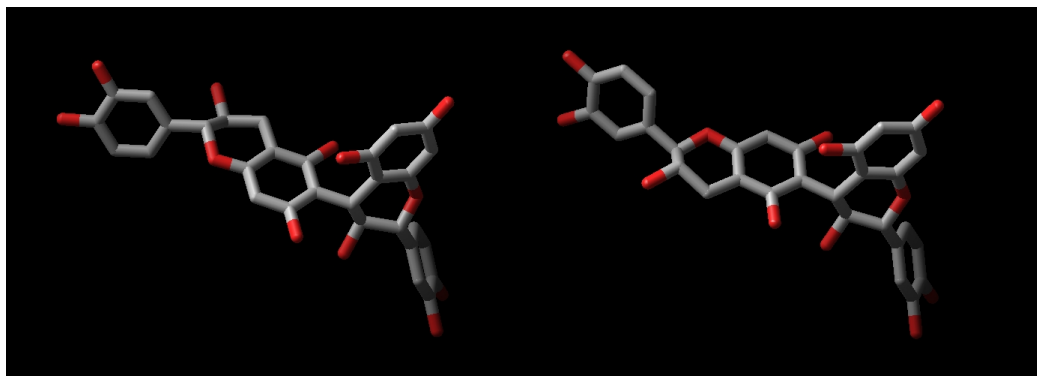


Figure 31 : Structure des deux rotamères du dimère B6.

#### Dimère B6 :

**RMN  $^1\text{H}$**  : ( $\text{D}_2\text{O}$  ou  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , 600MHz, ppm, two rotamers, Maj/min 48/52) : 7.04 ( $\text{H}2'\text{B}$ , min, s) ; 6.99 ( $\text{H}2'\text{B}$ , maj, s) ; 6.96 ( $\text{H}2'\text{E}$ , min, s) ; 6.95 ( $\text{H}2'\text{E}$ , maj, s) ; 6.95 ( $\text{H}6'\text{B}$ , min, s) ; 6.94 ( $\text{H}5'\text{B}$  ou E, maj ou min, s) ; 6.93 ( $\text{H}5'\text{B}$  ou E, maj ou min, s) ; 6.92 ( $\text{H}6'\text{B}$ , maj, s) ; 6.87 ( $\text{H}6'\text{E}$ , maj et min, m) ; 6.14 ( $\text{H}8\text{D}$ , maj, s) ; 6.05 ( $\text{H}6\text{A}$ , min ou maj, s) ; 6.03 ( $\text{H}8\text{A}$ , min ou maj, s) ; 6.02 ( $\text{H}8\text{D}$ , min, s) ; 6.01 ( $\text{H}8\text{A}$ , min ou maj, s) ; 6.00 ( $\text{H}6\text{A}$ , min ou maj, s) ; 4.69 ( $\text{H}2\text{C}$ , min, d,  $J_{2\text{C},3\text{C}} = 9.34$  Hz) ; 4.67 ( $\text{H}2\text{F}$ , maj ou min, d,  $J_{2\text{F},3\text{F}} = 9.64$  Hz) ; 4.59 ( $\text{H}2\text{C}$ , maj, d) ; 4.54 ( $\text{H}3\text{C}$ , min, t,  $J_{3\text{C},4\text{C}} = 10,11$  Hz) ; 4.51-4.49 ( $\text{H}3\text{C}$ , maj,  $\text{H}4\text{C}$ , min ou maj, m) ; 4.16 ( $\text{H}3\text{F}$ , maj ou min, m) ; 3.01 ( $\text{H}4\text{Fa}$ , min, ABX,  $J_{4\text{b},3} = 8.99$  Hz,  $J_{4\text{a},4\text{b}} = 15.98$  Hz,  $J_{4\text{a},3} = 5.55$  Hz) ; 2.78 ( $\text{H}4\text{Fa}$ , maj, ABX) ; 2.39 ( $\text{H}4\text{Fb}$ , min, ABX) ; 2.39 ( $\text{H}4\text{Fb}$ , maj, ABX).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  : (100.6 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , ppm, two rotamers Maj/min 48/52) :  $\delta = 26.8$  ( $\text{C}4\text{F}$ , maj) ; 27.7 ( $\text{C}4\text{F}$ , min) ; 36.9 ( $\text{C}4\text{C}$ , maj) ; 37.7 ( $\text{C}4\text{C}$ , min) ; 66.6/66.8, ( $\text{C}3\text{F}$ , maj/min) ; 71.8 ( $\text{C}3\text{C}$ , min) ; 72 ( $\text{C}3\text{C}$ , maj) ; 80.6/80.8 ( $\text{C}2\text{F}$ , maj/min) ; 81.9/82.4 ( $\text{C}2\text{C}$ , maj/min) ; 95.8 ( $\text{C}8\text{D}$ , maj) ; 97.0 ( $\text{C}8\text{A}$ , maj et min) ; 101.6 ( $\text{C}4\text{aD}$ , min) ; 102.6 ( $\text{C}4\text{aD}$ , maj) ; 106.0 ( $\text{C}4\text{aA}$ , maj) ; 106.9 ( $\text{C}4\text{aA}$ , min) ; 95.2 ( $\text{C}6\text{A}$ , maj/min) ; 111.3 ( $\text{C}6\text{D}$ , maj) ; 111.5 ( $\text{C}6\text{D}$ , min) ; 114.9 ( $\text{C}2''\text{E}$ , maj) ; 115.0 ( $\text{C}2''\text{E}$ , min) ; 115.2 ( $\text{C}2''\text{B}$ , maj) ; 115.6 ( $\text{C}2''\text{B}$ , min) ; 116.1/116.2 ( $\text{C}5''\text{C}/\text{C}5''\text{E}$ , maj/min) ; 120.0/120.2 ( $\text{C}6''\text{E}$ , maj/min) ; 120.5 ( $\text{C}6''\text{B}$ , maj) ; 120.8 ( $\text{C}6''\text{B}$ , min) ; 129.9/130.0 ( $\text{C}1'\text{B}$ , maj/min) ; 130.2/130.3 ( $\text{C}1'\text{E}$ , maj/min) ; 144.4 ( $\text{C}3'\text{B}$ , maj) ; 144.6 ( $\text{C}3'\text{B}$ , min) ; 144.3 ( $\text{C}3'\text{E}$ , maj/min) ; 144.0 ( $\text{C}4'\text{Bet}$   $\text{C}4'\text{E}$ , maj/min) ; 152.3 ( $\text{C}8\text{aD}$ , maj) ; 152.5 ( $\text{C}8\text{aD}$ , min) ; 153.3 ( $\text{C}5\text{D}$ , maj) ; 153.5 ( $\text{C}5\text{D}$ , min) ; 154.2 ( $\text{C}7\text{D}$ , maj/min) ; 154.7-155.5 ( $\text{C}5\text{A}$ ,  $\text{C}5\text{E}$ , maj/min) 156.4 ( $\text{C}8\text{aA}$ , maj) ; 156.5 ( $\text{C}8\text{aA}$ , min).

**SM** (LSIMS, m/z (intensité relative %)): 601 (2) [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  ; 409 (4) ; 381 (12) ; 353 (15) ; 329 (48) ; 311 (5) ; 242 (100) ; 212 (14).

**SMHR** : [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  = 601,1318

**Point de fusion** = 150°C

**Dimère B3 :**

**RMN 1H :** (400 MHz, H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O, ppm) :  $\delta$  = 6,87 (H5'B, d, 1H,  $J_{5'6'B}$  = 8,2 Hz) ; 6,83 (H5'E, d, 1H,  $J_{5'6'E}$  = 8,2 Hz) ; 6,80 (H2'B, d, 1H,  $J_{2'6'B}$  < 1 Hz) ; 6,61 (H2'E, d, 1H,  $J_{2'6'E}$  < 1 Hz) ; 6,61 (H6'B, dd, 1H) ; 6,46 (H6'E, dd, 1H) ; 6,15 (H6D, s, 1H) ; 6,00 (H6A, s, 1H) ; 5,71 (H8A, s, 1H) ; 4,58 (H2F, d, 1H,  $J_{23F}$  = 7,9 Hz) ; 4,39 (H2C, d, 1H,  $J_{23C}$  = 10,0 Hz) ; 4,36 (H4C, d, 1H,  $J_{43C}$  = 10,5 Hz) ; 4,29 (H3C, m, 1H) ; 3,92 (H3F, m, 1H) ; 2,85 et 2,49 (H4F $\alpha$  et H4F $\beta$ , ABX, 2H,  $J_{4F\alpha 4F\beta}$  = 15,8 Hz,  $J_{4F\alpha 3F}$  = 5,3 Hz et  $J_{4F\beta 3F}$  = 8,5 Hz)

**RMN 13C :** (100.6 MHz, H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 156,83 (C8aA) ; 155,24 (C5A) ; 154,73 (C7A) ; 154,07 (C7D) ; 153,15 (C8aD) ; 153,02 (C5D) ; 144,73, 144,08, 144,03 et 143,91 (C4'B, C3'E, C4'E et C3'B) ; 130,84 (C1'E) ; 130,65 (C1'B) ; 120,54 (C6'B) ; 120,17 (C6'E) ; 116,40 (C5'B) ; 116,04 (C2'B) ; 115,84 (C5'E) ; 115,16 (C2'E) ; 109,25 (C8D) ; 107,27 (C4aA) ; 101,51 (C4aD) ; 96,89 (C6A) ; 95,65 (C6D) ; 95,61 (C8A) ; 82,04 (C2C) ; 80,57 (C2F) ; 72,85 (C3C) ; 67,28 (C3F) ; 37,07 (C4C) ; 27,52 (C4F)

**SM** (LSIMS, m/z (intensité relative %)) : 579 (15 ; M) ; 473 (13) ; 449 (22) ; 433 (14) ; 413 (21) ; 329 (30) ; 306 (23) ; 289 (27) ; 284 (100) ; 247 (27)

**SMHR :**  $[M+Na]^+$  = 601,1319

**Point de fusion :** 218-220 °C

# **CHAPITRE III :**

## **METHODES ET ANALYSES RMN**

La Résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectrométrique idéale pour l'étude des protéines. Elle est à l'heure actuelle, avec la cristallographie des rayons X, une des deux seules techniques expérimentales permettant la détermination de structures tridimensionnelles de protéine à une résolution atomique. Mais au-delà de la biochimie structurale, la RMN permet également des informations sur la dynamique et les interactions entre protéines et ligands.

L'utilisation de la RMN en phase liquide permet de travailler dans des conditions proches de celles natives et permet dans notre cas l'utilisation d'un milieu mimant celui du vin. Ce milieu Vin ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{EtOD}$ , 80/8/12) est tamponné à un pH de 3,5 à l'aide d'acide acétique deutéré.

Au cours de notre étude, la RMN a été utilisée dans un but d'analyse de la structure des peptides IB9-14 et IB9-61 et des différentes procyanidines produites, mais également dans un but d'étude qualitative et quantitative des interactions de ces différents composés en présence ou non de sucre.

Pour cela, différentes séquences mono et multidimensionnelles ont été utilisées. Le principe de chaque méthode sera brièvement présenté dans le cas de l'étude.

## A- Bref rappel du principe de la RMN

La RMN se base sur le principe de Spin nucléaire. En anglais « to spin » veut dire tourner et le spin d'un noyau représente effectivement une propriété intrinsèque de certains noyaux dotés d'un moment cinétique non nul.

Dans ce cas précis, ces noyaux sont dotés d'un mouvement de charges électriques qui induira la création d'un moment magnétique  $\vec{\mu}$  qui pourra être parallèle ou antiparallèle au moment cinétique  $\vec{L}$  :

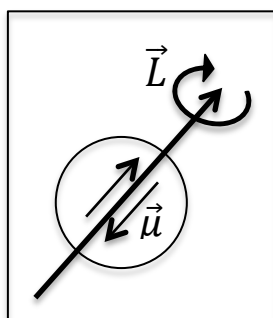


Figure 32 : Schéma des moments magnétiques ( $\vec{\mu}$ ) et cinétiques ( $\vec{L}$ ) d'un noyau

Ce moment cinétique est tel que :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L} \quad [\text{III-A}_1]$$

où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau. ;  $\gamma$  peut être positif si  $\vec{L}$  et  $\vec{\mu}$  sont dans le même sens, ou négatif si  $\vec{L}$  et  $\vec{\mu}$  sont en sens opposés.

Le rapport gyromagnétique  $\gamma$  est donc une caractéristique d'un noyau donné :

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad [\text{III-A}_2]$$

où  $I$  est le nombre quantique de spin nucléaire, entier ou demi-entier

Les noyaux étudiés pour la caractérisation des protéines en RMN sont majoritairement ceux possédant un nombre quantique de spin de  $1/2$ , comme c'est le cas pour les  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ .

Noyau	Nombre I	Rapport gyromagnétique ( $\gamma$ ) en $\text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$	Abondance naturelle du noyau (%)	Sensibilité	Fréquence de résonance (v) dans un champ magnétique de 14,1 T (MHz)
$^1\text{H}$	1/2	$26,7522 \cdot 10^7$	99,98	1	600
$^{15}\text{N}$	1/2	$-2,7126 \cdot 10^7$	0,37	$1,04 \cdot 10^{-3}$	60
$^{13}\text{C}$	1/2	$6,7283 \cdot 10^7$	1,108	$1,59 \cdot 10^{-2}$	150

Tableau 3 : Caractéristiques des noyaux les plus couramment utilisés en RMN.



Ainsi, si on place un de ces noyaux doté d'un moment magnétique non nul dans un champ magnétique principal,  $B_0$ , les spins vont précesser à la fréquence de Larmor  $\nu_0$ . La valeur de  $\nu_0$  est liée à  $B_0$  par la relation de Larmor :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad [\text{III-A}_3]$$

Dans un échantillon macroscopique contenant  $N$  noyaux, les spins vont alors s'orienter en fonction du champ de façon parallèle ou antiparallèle sur deux niveaux d'énergie selon la distribution de Boltzman :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad [\text{III-A}_4]$$

où  $N$  est la population de spins sur les niveaux de basse ( $\alpha$ ) et haute ( $\beta$ ) énergie,  $N = N_\alpha + N_\beta$ ,  $E$  l'énergie,  $K_B$  la constante de Boltzman et  $T$  la température.

En règle générale, le nombre de niveaux d'énergie observables est défini par  $2I + 1$ . Ainsi dans le cas d'un  $I = 1/2$ , les deux niveaux sont  $m = + 1/2$  et  $- 1/2$  (Figure 33).

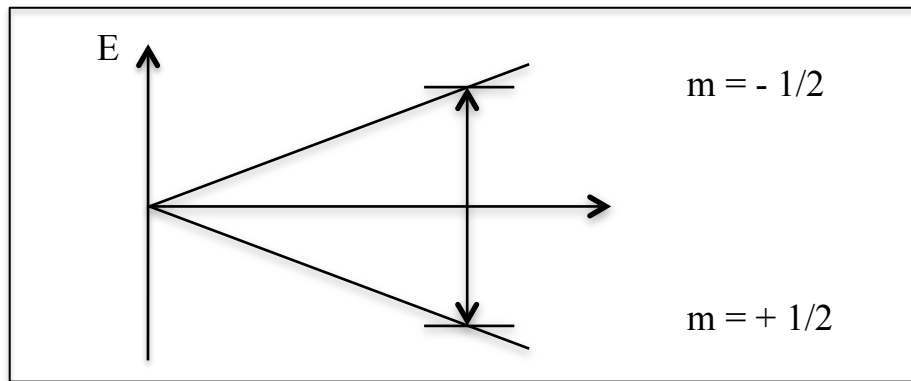


Figure33 : Niveaux d'énergie observables pour un noyau de spin  $1/2$ .

En raison de la répartition des spins sur ces deux niveaux d'énergie, il persiste une très légère différence de population entre ces deux états. L'excès de magnétisation sur un niveau est appelé la magnétisation macroscopique ( $M_0$ ). Cette aimantation globale  $M_0$  est orientée le long de l'axe  $Z$  sous l'effet du champ principal de l'aimant  $B_0$  (Figure 34 A).

Si on applique à l'échantillon un deuxième champ radiofréquence  $B_1$  tournant à la fréquence de Larmor du noyau que l'on cherche à étudier ( $\nu_0$ ), ce champ  $B_1$  va interagir avec les spins et perturber leur distribution entre les niveaux d'énergie dus au champ fixe  $B_0$ . L'aimantation  $M_0$  va basculer dans le plan  $xoy$  (Figure 34 B). L'angle de  $M_0$  avec  $z$  sera tel que :

$$\theta = 2\pi\nu_0 t = \omega_0 t = \gamma B_1 t \quad [\text{III-A}_5]$$

Le temps d'impulsion de  $B_1$  le long de l'axe X va pouvoir être réglé grâce à la relation:

$$t_p = \pi/(\gamma B_1) \quad [\text{III-A}_6]$$

On va ainsi régler ce temps d'impulsion de telle sorte que  $M_0$  se retrouve sur l'axe y (précession autour de  $B_1$ ). Cette projection sur l'axe y est obtenue pour un angle de basculement  $\theta = 90^\circ$  (Figure 34 C).

Lorsque l'on arrête le champ tournant  $B_1$ , le système retourne progressivement à l'état d'équilibre initial, c'est le phénomène de relaxation.  $M_0$  va revenir à sa position d'équilibre en tournant à sa fréquence caractéristique ( $\nu_0$ ) tout en revenant le long de l'axe z (Figure 34 D). Ce retour à l'état d'équilibre peut se décomposer en deux relaxations simultanées : une longitudinale (spin-réseau) selon l'axe z (Figure 34 E) et une relaxation transversale (spin-spin) par rapport au plan xy de détection (Figure 34 F). L'évolution par rapport à l'axe y constitue le signal de précession libre des spins (FID : Free Induction Decay), évoluant sous la forme d'une cosinusoïde amortie en fonction du temps. Ce signal périodique peut être enregistré grâce à un solénoïde de détection (en général le même que pour l'excitation).

Après numérisation du signal, un traitement mathématique, la transformée de Fourier est appliquée permettant de passer du domaine temporel au domaine fréquentiel. En RMN en solution, on obtient un spectre composé de raies dont la position en fréquence est associée à l'environnement électronique des noyaux et la largeur des raies à la dynamique des molécules.

Le déplacement chimique ( $\delta$ ) observable sur le spectre caractérise la résonance d'un noyau et se détermine par sa position dans le spectre par rapport à une référence. Ce déplacement est indépendant de  $B_0$  et s'exprime en ppm. La valeur de l'ensemble des déplacements chimiques étudiés est calibrée en utilisant une référence interne le TSP dont le déplacement chimique est fixé à 0 ppm. Ainsi, quelque soit la puissance du champs  $B_0$  de l'aimant, les spectres seront comparables les uns aux autres. L'analyse fine des positions des raies sur le spectre permet de remonter à la structure du composé.

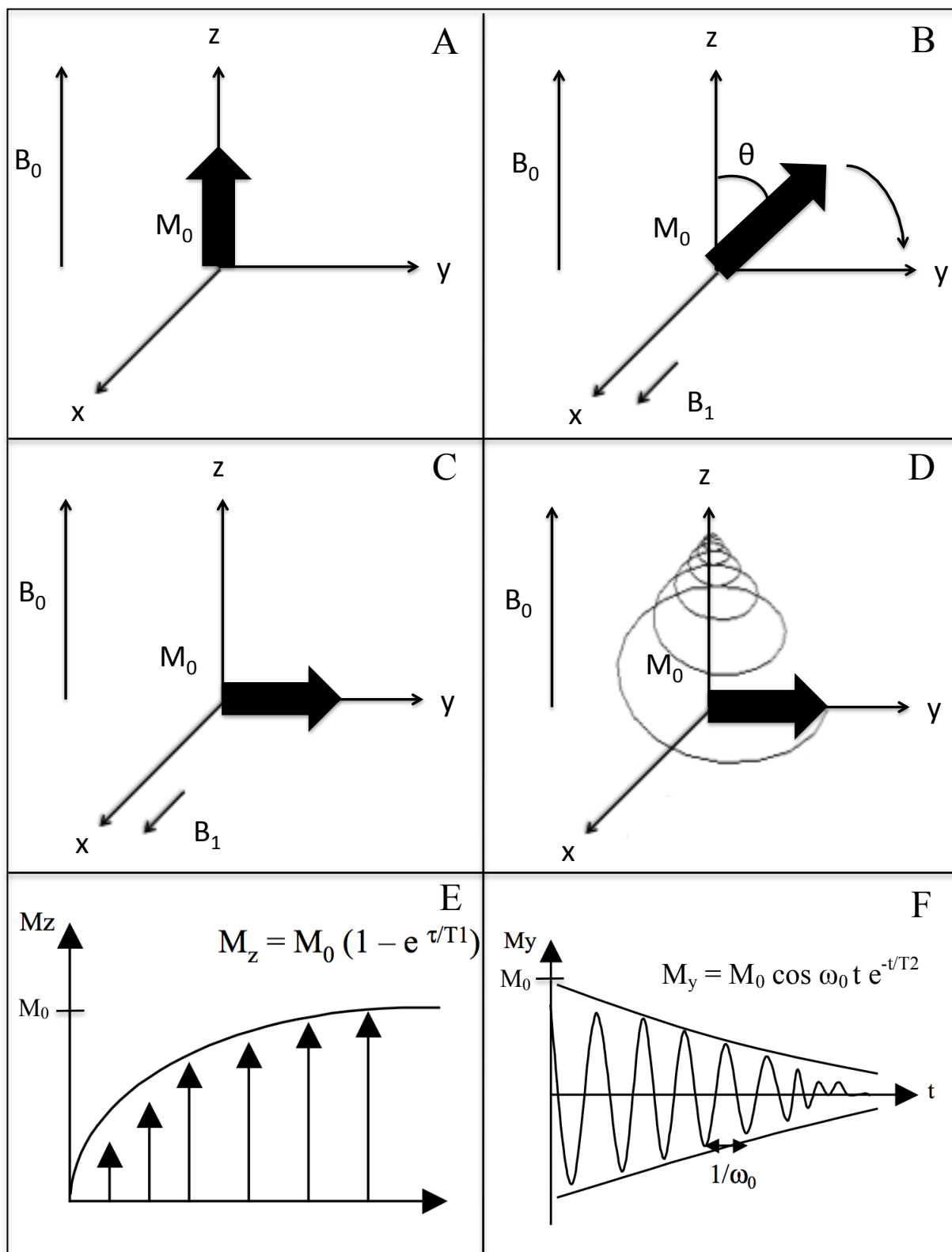


Figure 34 : Principe d'obtention d'un spectre RMN : A application d'un champ  $B_0$ , aimantation globale le long de l'axe  $z$  ; B application d'un champ RF  $B_1$  ; C basculement de l'aimantation globale à  $90^\circ$  sur l'axe  $y$  ; D arrêt du champ  $B_1$  et remontée de l'aimantation sur l'axe  $z$  selon 2 relaxations longitudinale et transversale ; E relaxation longitudinale de temps caractéristique  $T_1$  ; F relaxation transversale de temps caractéristique  $T_2$  : FID,  $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ .

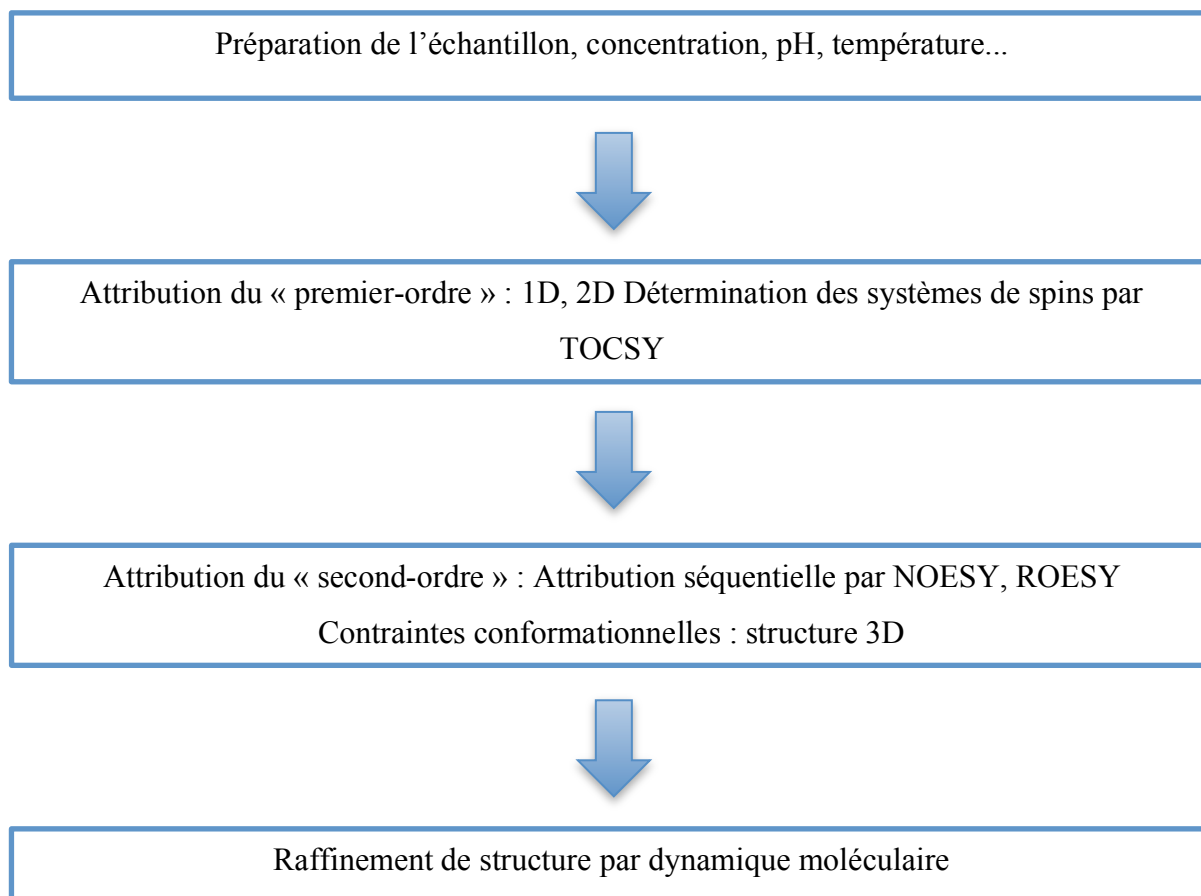
## B-Analyse structurale

Dans une protéine, le nombre de protons est très important ce qui entraîne un recouvrement partiel de nombreux pics dans un spectre de RMN des liquides à 1 dimension (RMN 1D). De plus, la composition à 70% en trois résidus des PRPs augmente le chevauchement des signaux, rendant l'interprétation du spectre 1D difficile. Mais cette difficulté peut être contournée en utilisant la RMN multidimensionnelle afin d'éclater les raies de résonance dans un espace à 2, 3 voire 4 dimensions.

La RMN bidimensionnelle (2D) homonucléaire ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) nous a suffi pour réaliser l'attribution des protons du peptide IB9-14. La RMN 2D hétéronucléaire ( $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ ) et ( $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ ) a, quant à elle, été utilisée pour l'attribution de la protéine complète IB9-61. On notera que la protéine n'est pas marquée, l'enregistrement des données RMN s'est faite en utilisant l'abondance isotopique naturelle malheureusement faible des noyaux  $^{13}\text{C}$  (1,1%) et  $^{15}\text{N}$  (0,4%).

La détermination structurale de protéines par RMN se déroule en plusieurs étapes, dont la stratégie a été définie par Wüthrich [153] : un échantillon de protéine est solubilisé à une concentration suffisante (ordre du mM) dans des conditions de pH et de température fixées. La première étape consiste en l'attribution de tous les protons de la protéine par acide aminé, chacun étant considéré comme un système de spin (séquence TOCSY). La deuxième étape permet de relier les acides aminés en fonction de leur emplacement dans la chaîne peptidique et donc d'accéder à la structure primaire (séquences NOESY ou ROESY). Ensuite, un autre jeu de séquences multidimensionnelles procure des contraintes conformationnelles d'angles et de distances entre les atomes, qui sont enfin utilisées par la modélisation moléculaire pour remonter à la structure secondaire et tertiaire de la protéine.

La stratégie d'attribution développée par Wüthrich est schématisée ci-dessous : (Figure 35)



*Figure 35 : Schéma de la stratégie adoptée pour la caractérisation en structure 3D des peptides étudiés. D'après Wuthrich et al. 1989 [153].*

## 1. Attribution des systèmes de spins

La première étape de cette stratégie consiste à attribuer l'ensemble des protons de la protéine. Pour cela il est nécessaire d'identifier les systèmes de spins à l'aide de différentes séquences RMN bidimensionnelles composées de plusieurs étapes : la préparation des spins, le temps d'évolution, le temps de mélange (seulement dans certaines séquences) et la détection.

Au cours de notre étude, nous avons utilisé une séquence bidimensionnelle de type TOCSY (Total Correlation SpectroscopY) développée par Nagayama [154], puis améliorée par la suite par Braunschweiler et Bax [155, 156].

Cette séquence permet de mettre en évidence les couplages scalaires entre tous les protons appartenant à un même système de spin, c'est-à-dire à un même résidu dans le cadre d'une protéine. En effet, l'introduction d'un temps de mélange isotrope permet le transfert de l'aimantation entre les spins couplés le long de la chaîne latérale, ce transfert se propageant tant qu'il existe un couplage relayé. Par exemple dans le cas d'une glutamine (Figure 36) l'ensemble des couplages du NH avec les H $\alpha$ , H $\beta$ , et H $\gamma$  peut être observé.

Le spectre obtenu est une carte RMN en deux dimensions où la diagonale correspond à la projection dans le plan du spectre 1D. Les taches hors diagonale correspondent aux corrélations TOCSY. La carte étant symétrique, les taches verticales et horizontales sont identiques et permettent d'identifier tous les systèmes de spins grâce à leur chemin de corrélation spécifique (Figure 36) [157].

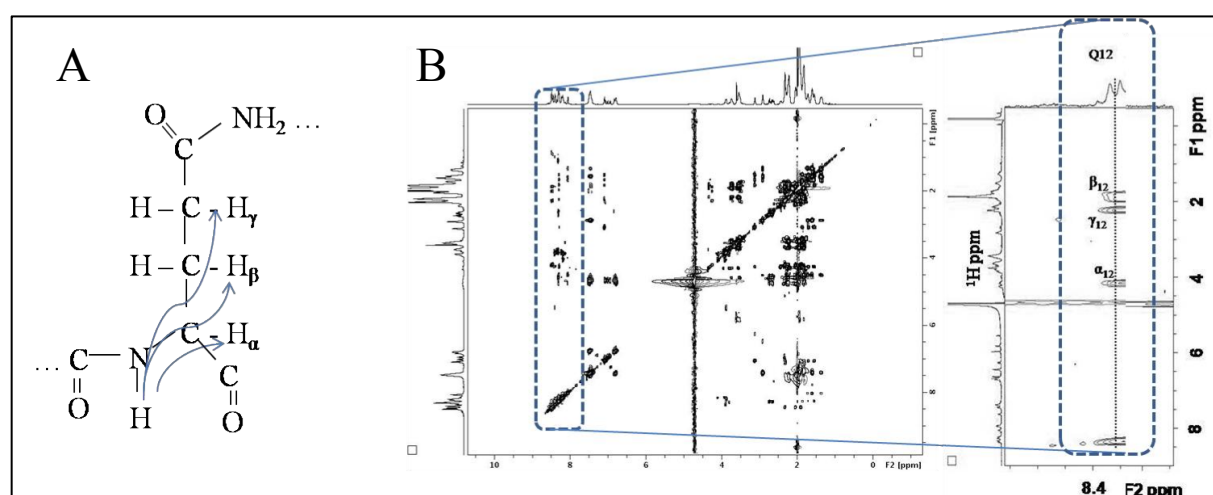


Figure 36 : Structure planaire de la glutamine dans un peptide (A) Carte TOCSY permettant l'identification des différents systèmes de spins, avec l'exemple de la glutamine Q12 d'IB9-14 (B).. D'après Cala 2010 [157].

## 2. Attribution séquentielle et structure

La deuxième étape, après l'identification de chaque système de spin, consiste à attribuer une position exacte à chaque acide aminé au sein de la séquence primaire à l'aide de la méthode d'attribution séquentielle développée par Wüthrich [153]. Cette méthode permet, grâce à l'utilisation de cartes de type NOESY ou ROESY (respectivement Nuclear Overhauser Spectroscopy et Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy), de déterminer l'enchaînement des acides aminés et d'établir des contraintes de distance donnant des indications sur la proximité entre deux atomes des acides aminés de la séquence.

Ces séquences sont basées sur l'interaction dipôle-dipôle entre protons proches dans l'espace ( $\leq 5\text{\AA}$ ) et s'appuient sur l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) [158]. Celui-ci correspond à une variation de l'aimantation correspondant à l'intensité du signal d'un spin I lorsqu'on perturbe l'aimantation d'un spin S voisin dans l'espace en interaction avec I au travers d'interactions spin-spin directes (couplages dipolaires). L'effet NOE peut être négatif, nul ou positif en fonction de la masse molaire des peptides ou protéines. Tout comme dans le cas de la séquence TOCSY, le spectre associé à la séquence NOESY/ROESY est une carte à deux dimensions.

La différence entre NOESY et ROESY repose sur l'utilisation d'un champ radiofréquence supplémentaire appelé « spin lock » permettant de verrouiller la composante de l'aimantation transversale le long de l'axe y' du référentiel tournant. De cette manière, l'effet NOE reste toujours positif quelque soit la masse du peptide.

Ainsi cette méthode d'attribution séquentielle repose sur l'existence systématique dans ces cartes de corrélations (interaction spin-spin directe) entre le proton  $H\alpha$  d'un résidu (i) et le proton NH du résidu suivant (i+1) (Figure 37 A).

Cette méthode est valable pour tous les acides aminés à l'exception du résidu proline dont la chaîne latérale est cyclisée sur l'azote tertiaire. Mais l'observation d'effets NOEs entre le proton  $H\delta$  de la proline et le proton  $H\alpha$  du résidu précédent (i-1) reste possible et nous donne tout de même des informations séquentielles (Figure 37 B).

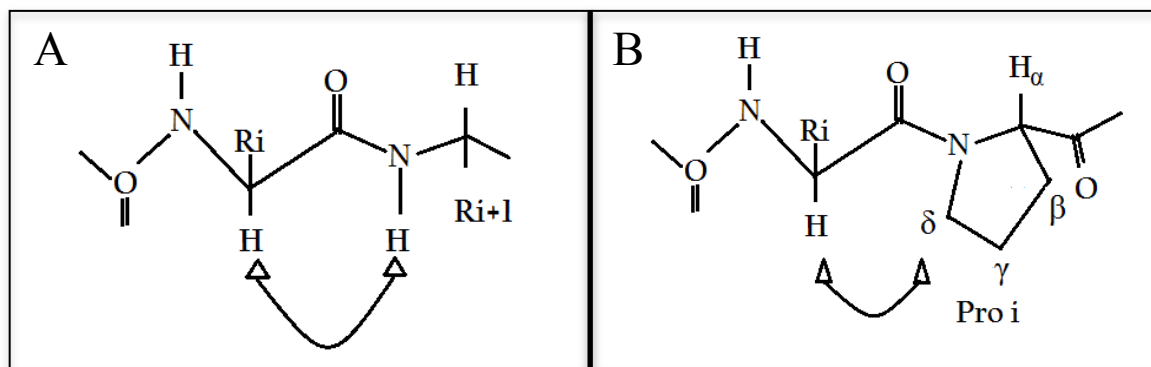


Figure 37 : Principe d'attribution séquentielle, dans le cas classique d'une chaîne peptidique linéaire (A); et dans le cas spécifique de la proline (B).

De plus, une fois l'attribution séquentielle achevée, il reste à obtenir des informations spatiales sur le repliement du squelette ou la conformation des chaînes latérales. Ces informations sont apportées par deux paramètres, les valeurs de constantes de couplage à  $^3J$  et les effets NOEs. Les valeurs des constantes de couplage scalaire  $^3J$  (à trois liaisons H-C-C-H) sont en effet corrélées aux valeurs des angles dièdres entre atomes voisins et nous informent donc sur les contraintes d'angles du squelette protéique [159]. Ces valeurs sont mesurées soit directement sur le spectre 1D, soit grâce à l'utilisation d'une séquence COSY avec un filtrage double quanta (COSY-DQF) [160]. La relation existant entre les constantes  $^3J$  et les angles dièdres est définie selon la relation de Karplus :

$$^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad [\text{III-B2}_1]$$

avec A, B et C des constantes, dont les valeurs sont respectivement 6,4 ; -1,4 et 1,9 Hz dans le cadre des protéines [161].

De plus, une fois que tous les effets NOE séquentiels ( $H\alpha_i$  et  $NH_{i+1}$ ) ont été attribués, il reste sur les cartes NOESY/ROESY les taches de corrélations à  $i+2$ ,  $i+3$ ,  $i+4$ , indiquant une estimation de la distance des protons dans l'espace en fonction de l'intensité des pics (entre 2 Å et 6 Å). En effet, l'examen de ces effets NOE permet de mettre en évidence l'existence de motifs de structures secondaires ainsi que des repliements tridimensionnels de la protéine. La distance entre deux protons est inversement proportionnelle à l'intensité des taches de corrélation. Ainsi, si l'on connaît une distance de référence  $r_{\text{ref}}$ , on peut alors déterminer une distance inconnue  $r_i$  grâce à la relation suivante :

$$r_i = r_{\text{ref}} \left( \frac{S_{\text{ref}}}{S_i} \right)^{1/6} \quad [\text{III-B2}_2]$$

où  $S_{\text{ref}}$  et  $S_i$  sont respectivement l'intensité des taches de corrélation entre les protons ref et i.



L'obtention de ces valeurs de distances inter proton et d'angles de torsion permet ainsi d'établir des listes de contraintes géométriques utilisées lors de la dernière étape de la méthodologie de Wüthrich. Cette dernière étape consiste à entrer ces jeux de contraintes dans un logiciel de modélisation moléculaire (comme ARIA ou CYANA) qui, à la suite d'une modélisation sous contrainte, permet d'obtenir la structure du peptide.

## C-Analyse des interactions

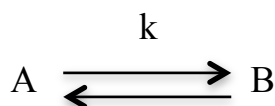
Après avoir vérifié la structure du peptide IB9-14 et avoir déterminé celle de la protéine IB9-61 grâce à la méthodologie de Wüthrich, différentes techniques de RMN ont été utilisées afin d'étudier les interactions entre ces peptides, les tanins du vin et les sucres utilisés au cours de cette étude.

Tout d'abord, des analyses de variations de déplacement chimique et de coefficient de diffusion [162-164] nous ont permis de caractériser les interactions en déterminant les affinités avec des valeurs de  $K_a$  et  $K_d$ , ainsi que les stœchiométries des systèmes étudiés. D'autre part, l'utilisation de séquence NOESY/ROESY et de différence de transfert de saturation (STD) nous a permis à la fois d'identifier les sites de fixations et de valider les constantes de dissociation dans les cas du STD. Finalement, une analyse des signaux par intégration sur les spectres proton 1D couplée à des expériences RMN HRMAS a finalement été réalisée afin d'observer la possible formation de colloïdes et/ou d'agrégats.

### 1. Analyse des déplacements chimiques

#### a. Les différents régimes d'échange

La RMN permet en effet d'obtenir des informations dynamiques sur des systèmes en échange. Si on a deux espèces A et B :



L'aspect du spectre change en fonction de la vitesse de l'échange entre les formes A et B pouvant représenter les formes libres et liées d'un ligand ou un changement conformationnel (Figure 38).

En effet en RMN, l'échelle de temps est donnée par la différence de fréquence de résonance  $\Delta\nu$  entre les deux espèces en échange. Ainsi dans le cas d'un échange « lent » où la vitesse d'échange  $k$  est plus petite que  $\Delta\nu$ , deux signaux distincts sont observables. Un premier pic correspondant à la forme A et un deuxième à la forme B. En revanche, dans le cas d'un échange « rapide » où la vitesse d'échange  $k$  est plus grande que  $\Delta\nu$ , un signal unique est observable. Il représente un déplacement chimique moyen dont la position dépend de la

fraction de A ( $f_A$ ) et de B ( $f_B$ ) dans le mélange ainsi que des déplacements chimiques  $\delta_A$  et  $\delta_B$  des espèces hors échange, tel que :

$$\delta = f_A \delta_A + f_B \delta_B \quad [\text{III-C1}_1]$$

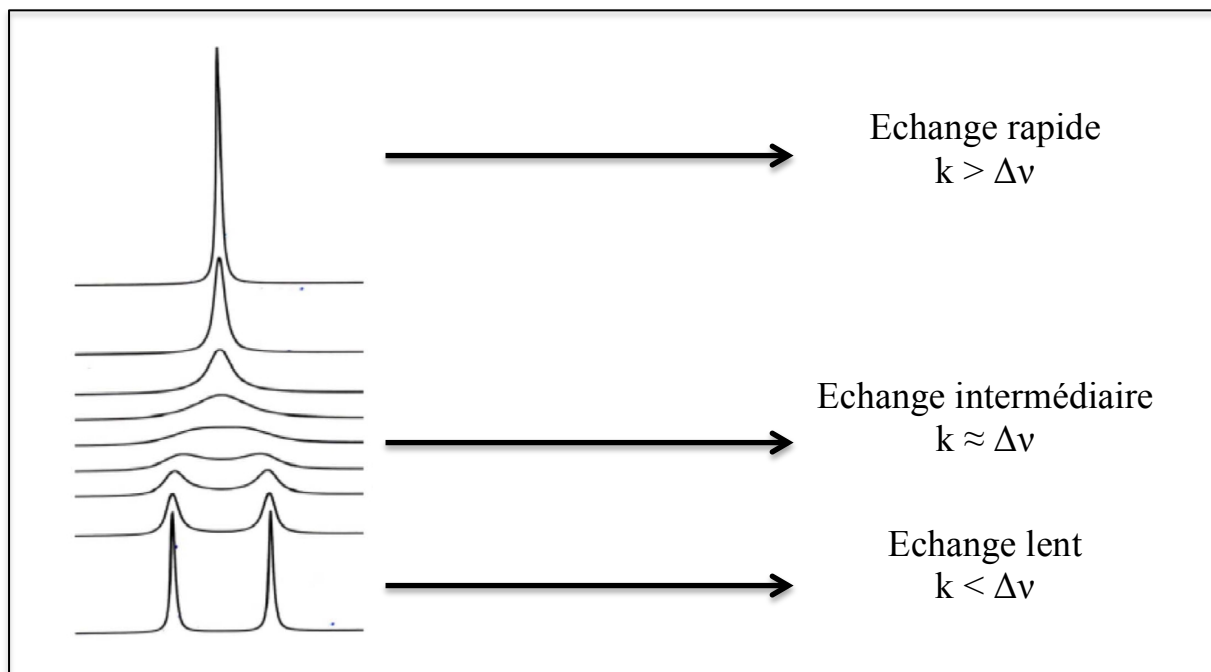
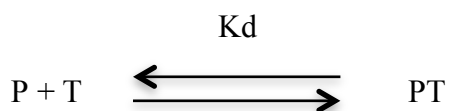


Figure 38 : Effet de la vitesse d'échange sur l'allure d'un spectre 1D.

## b. Analyses des variations de déplacements chimiques

### i. Cas des interactions tanins-protéines

Quand une interaction est réalisée entre un ligand (le tanin) et son hôte (le peptide), l'environnement chimique de certains protons de l'hôte (dans notre cas les protons des acides aminés impliqués dans l'interaction) va être modifié, créant ainsi une modification de la valeur du déplacement chimique initial. Ainsi, il est possible de suivre la variation de la valeur du déplacement chimique ( $\delta$ ) de certains protons du peptide lors de l'ajout pas à pas du ligand. Dans le cas d'une fixation spécifique, à l'équilibre :



Avec  $K_d = [P][T]/[PT]$

Ainsi si cet équilibre est dit rapide à l'échelle du temps de la RMN, comme présenté précédemment, un seul déplacement chimique sera observé ( $\delta_{obs}$ ), qui correspondra à une pondération entre le peptide seul et le peptide associé à un tanin. Ainsi l'équation III-C1<sub>1</sub> donnera :

$$\delta_{obs} = \frac{[P]}{[T]} \delta_P + \frac{[PT]}{[P_0]} \delta_{PT} \quad [III-C1_2]$$

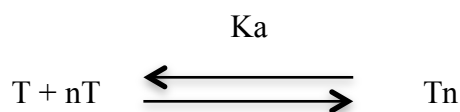
De cette façon, lors des différentes expériences de titration réalisées dans cette étude, les variations de déplacements chimiques de certains protons du peptide ont été analysés en fonction de la concentration en tanins et/ou en sucres en utilisant une équation décrite préalablement pour un système à sites multiples [107] adapté au déplacement chimique (voir détail en annexe):

$$\Delta\delta = 1/2 \Delta\delta_{max} \left( 1 + \frac{Kd}{n[P_0]} + \frac{[Ti]}{n[P_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{Kd}{n[P_0]} + \frac{[Ti]}{n[P_0]} \right) - 4 \frac{[Ti]}{n[P_0]} \right\}^{1/2} \quad [III-C1_3]$$

où  $\Delta\delta$  est la variation de déplacement chimique (ppm) ;  $\Delta\delta_{max}$ , la variation maximale de déplacement chimique entre la valeur du déplacement chimique de la protéine seule ou saturée par les tanins ; Kd, la constante de dissociation exprimée en M ; [Ti], la concentration totale en polyphénol pouvant se fixer au peptide exprimée en M, en tenant compte de leur capacité à s'auto-associer ( $[Ti] = [T]/(1-Ka[T])$ ) où Ka est la constante d'auto-association ;  $[P_0]$ , la concentration totale du peptide exprimée en M ; et n le nombre de sites de fixation des tanins. Kd, n et  $\Delta\delta_{max}$  ont été calculés en minimisant la différence entre la courbe et les points expérimentaux, par un paramétrage à l'aide de l'équation et de l'outil d'analyse de simulation du logiciel Excel.

## ii. Cas de l'auto-association des tanins

Les tanins sont connus pour former des micelles ou agrégats de plus ou moins grandes tailles par auto-association selon un modèle isodesmique, c'est à dire où l'association s'effectue pour former des empilements avec 2 puis 3, 4, 5, etc. molécules de tanins de façon non coopérative et indéfinie avec une constante d'équilibre d'auto-association (Ka) identique pour chaque étape [86]:



Ainsi la modélisation du déplacement chimique observé, à l'aide d'une équation traduisant le comportement isodesmique des tanins nous a permis de déterminer leur constante d'auto-association  $K_a$  [86] :

$$\Delta\delta = |\delta_{obs} - \delta_{libre}| = (\delta_{micelle} - \delta_{libre})K_a[C_0] \left\{ \frac{2}{1+(K_a[C_0]+1)^{1/2}} \right\}^2 \quad [\text{III-C14}]$$

avec  $\delta_{obs}$  déplacement chimique observé;  $\delta_{libre}$  le déplacement chimique des molécules non associées ;  $\delta_{micelle}$  le déplacement chimique des molécules engagées dans une micelle et  $C_0$  la concentration totale en tanin.

Cette auto-association des tanins peut conduire à un comportement colloïdal spécifique, proche de celui de la micellisation, qui peut être caractérisé par une valeur de Concentration Micellaire Critique (CMC). En dessous de cette CMC, les espèces moléculaires sont préférentiellement sous forme libre alors qu'au-delà elles prédominent sous une forme d'agrégats.

L'analyse des variations de déplacements chimiques permet également la détermination de la CMC à partir du tracé des déplacements chimiques en fonction de l'inverse de la concentration en tanins. L'intersection entre la droite à la pente initiale et la droite au plateau une fois l'équilibre atteint nous donne directement la valeur de la CMC (cf chapitre IV).

## 2. Analyse des coefficients de diffusion

Dans un solvant isotrope, la diffusion translationnelle d'une molécule suit un mouvement brownien de temps de corrélation  $\tau_c$ . Ce mouvement se caractérise par un coefficient de diffusion  $D$  associé à la taille de la molécule comme le montre la relation de Stokes-Einstein :

$$D = k_B T / (6\pi\eta R_H) \quad [\text{III-C21}]$$

Où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $\eta$  la viscosité en poiseuille du solvant utilisé, et  $R_H$  le rayon hydrodynamique de la molécule ou du complexe supramoléculaire considéré en moyenne sphérique.

Ces mesures de coefficient de diffusion translationnel sont réalisées à l'aide d'expériences RMN de type DOSY. Cette technique permet de différencier les espèces présentes en solution en fonction de leur masse molaire, de leur taille et de leur forme, permettant l'étude de systèmes très variés allant de l'étude des interactions intermoléculaires

[164-166] aux mécanismes d'agrégation moléculaire [87, 117] ou encore à l'étude des liquides ioniques [167].

Dans notre cas, le suivi du coefficient de diffusion  $D$  des tanins en fonction de différents sucres, ainsi que des peptides en fonction des différents tanins ajoutés (en présence de sucre ou non) va nous permettre de déterminer la taille des différents complexes formés mais également les constantes d'auto-association, les constantes de dissociation et les CMC en employant la même méthodologie que pour la variation de déplacements chimiques (cf. chapitre III-C1).

Pour les constantes d'auto-association des tanins, l'équation [III-C1<sub>4</sub>] est simplement reprise en remplaçant  $\delta_{obs}$  par  $D_{obs}$ ,  $\delta_{micelle}$  par  $D_{micelle}$  et  $\delta_{libre}$  par  $D_{libre}$  :

$$\Delta D = |D_{obs} - D_{libre}| = (D_{micelle} - D_{libre})Ka[C_0] \left\{ \frac{2}{1+(Ka[C_0]+1)^{1/2}} \right\}^2 \quad [III-C2_2]$$

Pour les constantes de dissociation tanins-protéines  $\Delta\delta$  et  $\Delta\delta_{max}$  sont remplacés par  $\Delta D$  et  $\Delta D_{max}$  dans l'équation [III-C1<sub>3</sub>].

$$\Delta D = 1/2 \Delta D_{max} \left( 1 + \frac{Kd}{n[P_0]} + \frac{[T_i]}{n[P_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{Kd}{n[P_0]} + \frac{[T_i]}{n[P_0]} \right) - 4 \frac{[T_i]}{n[P_0]} \right\}^{1/2} \quad [III-C2_3]$$

Les CMC des tanins sont calculées en représentant l'évolution de  $D$  en fonction de l'inverse de la concentration en tanins.

La mesure de coefficient de diffusion translationnel est réalisée à l'aide de séquences unidimensionnelles basées sur un écho de spin stimulé en parallèle par l'utilisation de gradients bipolaires (séquence de type *stebpgp1d* ou *bpled*- Bruker) (Figure 39) [163, 168, 169].

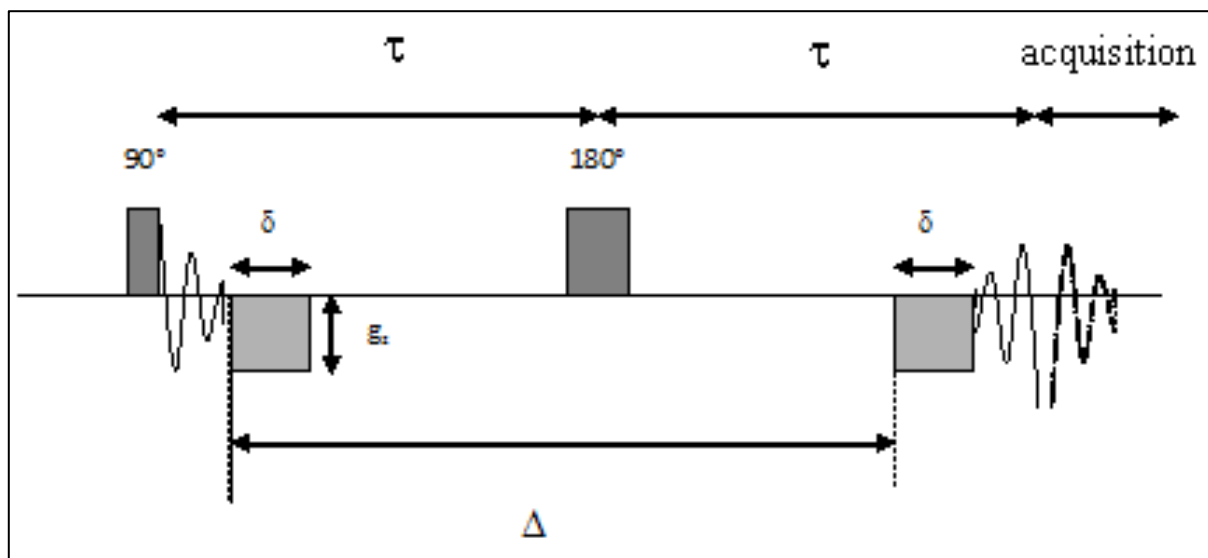


Figure 39 : Schéma de la séquence RMN DOSY présentant deux impulsions de 90° et 180° respectivement avec emploi de gradients de même intensité  $g$  et de même durée  $\delta$  suivant les impulsions et séparés d'un délai  $\Delta$ . D'après Cohen et al. 2005 [164].

Dans ce type de séquence, l'impulsion à 180° inverse le signe du premier gradient de sorte que si les spins observés ne diffusent pas, on se retrouve dans le cas d'une séquence d'écho de spin normale où la totalité du signal se refocalise et où le signal est maximal après l'écho (au niveau de l'acquisition). En revanche, dans le cas de spins qui diffusent, la refocalisation ne se fera pas complètement et de ce fait l'intensité du signal obtenu après l'écho sera plus faible. Cette technique consiste à faire disparaître le signal au fur et à mesure de l'augmentation des gradients de telle sorte que plus une molécule diffusera vite, plus le signal diminuera rapidement avec l'augmentation des gradients. La puissance et le temps d'impulsion des gradients sont calibrés de telle sorte qu'entre l'application de 2% et 95% de gradient  $z$ , il ne reste en fin d'expérience qu'un signal résiduel d'environ 5 à 10% du signal de départ. Il existe une relation directe entre l'intensité du signal résiduel et le gradient appliqué [170] :

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -[\gamma^2 \times \delta^2 \times G_z^2 \times (\Delta - \delta/3)] D \quad [\text{III-C24}]$$

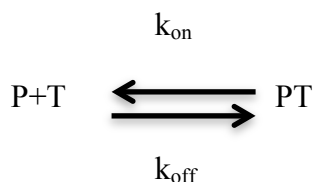
Avec  $I_0$  et  $I$  respectivement les intensités du signal à 2% et du signal résiduel,  $\gamma$  le rapport gyromagnétique,  $\Delta$  et  $\delta$  le temps de diffusion et la durée d'application des gradients respectivement.

Cette équation met en évidence une relation de proportionnalité entre le coefficient de diffusion  $D$  et l'intensité du signal. Ainsi en traçant la courbe décroissante de  $\ln(I/I_0)$  en fonction du carré des gradients  $G_z^2$ , on obtient une droite dont la pente permet de remonter à la valeur du coefficient de diffusion  $D$  en  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

Avant toute mesure de DOSY, le gradient propre du spectromètre doit être calibré. Pour cela différents échantillons dont le coefficient de diffusion est connu (sous certaines conditions de concentration et de température), sont testés. Communément, on utilise de l'eau dont le coefficient de diffusion transversal à 298K est égal à  $2.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  [170].

### 3. Expériences STD

La caractérisation d'interactions entre un ligand et une protéine est possible depuis plusieurs années grâce à l'emploi d'expériences de RMN par Saturation Transfer-Difference (STD). Si on prend en compte une protéine P et son ligand L on peut écrire la relation suivante :



Ainsi,  $K_d = k_{\text{on}} / k_{\text{off}} = [\text{P}][\text{T}] / [\text{PT}]$

Ces expériences de transfert de saturation développées dans les années 1960 [171] trouvent actuellement un nouvel essor à travers leur utilisation dans le domaine du screening par RMN, en particulier, sous l'impulsion de Mayer et Meyer [172].

Cette technique se révèle ainsi particulièrement efficace pour cribler des banques de ligands mais également pour définir des épitopes de liaison. Elle est de plus utilisable dans une plus large gamme d'affinité entre ligand et récepteur que l'expérience TRNOE ( $K_d$  de  $10^{-3}$  à  $10^{-8}$  M) [173].

De plus, cette méthode permet également d'identifier au niveau atomique les protons les plus impliqués dans une interaction. C'est ce dernier cas qui nous a intéressés dans le cadre de notre étude.



Le principe de cette technique est basé sur une saturation spécifique des protons du récepteur par une impulsion sélective. Cette saturation va alors se propager au sein du récepteur par diffusion de spin par transfert intramoléculaire. Ainsi, en présence d'un ligand, cette saturation va également se propager au ligand (Figure 40).

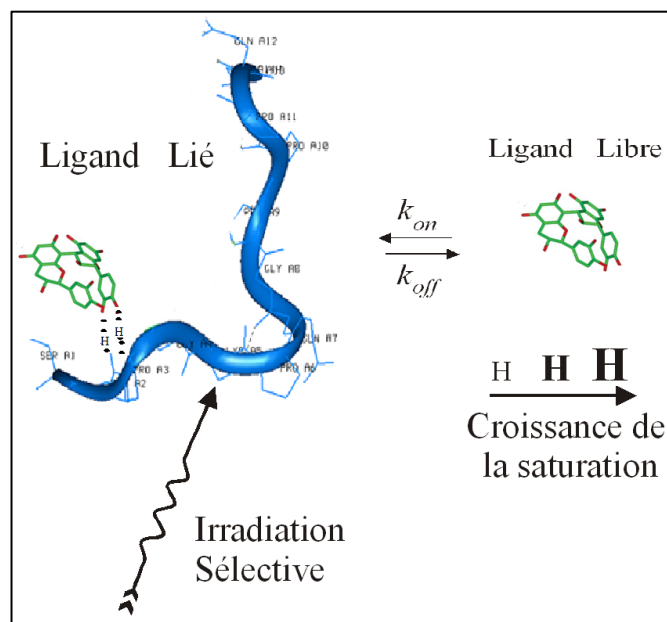


Figure 40 : Principe de l'expérience STD. Au cours de l'association ligand / récepteur, la saturation du récepteur est transmise à la conformation liée du ligand. Lors de la dissociation, cette saturation est détectée sur la forme libre du ligand. Le degré de saturation traduit la proximité des protons du ligand avec la surface du récepteur. D'après Cala 2010 [157].

Cette technique peut de plus, s'appliquer aussi bien à des expériences 1D que 2D comme dans le cas de l'expérience HSQC ou TOCSY par exemple [174].

Dans tous les cas, deux spectres sont enregistrés, *on-resonance spectrum* et *off-resonance spectrum*. Le premier correspond à un spectre avec saturation des protons du récepteur ( $I_{SAT}$ ) et le deuxième sans saturation ( $I_0$ ). Ainsi, lors de la saturation du récepteur, les signaux des protons du ligand les plus proches de la surface du récepteur vont être également saturés, et leurs signaux seront atténués. De cette manière, en réalisant le spectre différence  $I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$ , on ne va observer que les signaux modifiés des atomes du ligand impliqués dans l'interaction. Les signaux correspondants aux impuretés ou au récepteur seront soustraits.

L'emploi de cette séquence va donc permettre d'observer uniquement les signaux des protons du ligand impliqués dans l'interaction. Ainsi, il sera alors possible d'identifier un ou plusieurs ligands entrant en interaction avec la protéine cible.

Pour une molécule qui se liera à la protéine, seuls les signaux des hydrogènes en contact proche à la protéine ( $\leq 5 \text{ \AA}$ ) et recevant le transfert de magnétisation apparaîtront dans le spectre de différence. Plus ces  $^1\text{H}$  seront proches, plus leur signal sera intense [175] (Figure 41).

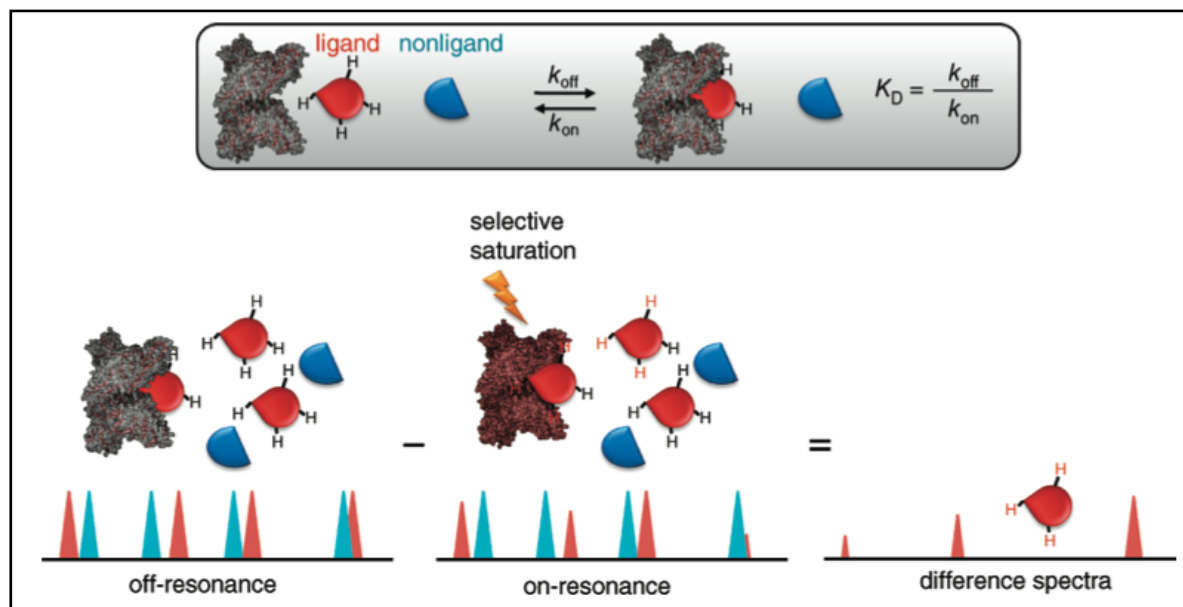


Figure 41 : Principe de l'obtention d'un spectre de différence par l'expérience de STD. Ce spectre de différence est obtenu par soustraction des spectre off- et on-resonance. D'après A. Viegas 2011 [175].

Pour transformer une séquence traditionnelle en séquence STD, il faut lui apporter quelques modifications. Dans un premier temps, il faut y ajouter un train d'impulsions directement après le délai de relaxation D1 et avant la première impulsion à  $90^\circ$ . Dans notre cas, un train de 40 gaussiennes de 50 ms séparées par un délai de 1 ms a été utilisé afin de pouvoir saturer sélectivement les protons du peptide (Figure 42). Dans un second temps, il faut changer le cyclage de phase du récepteur afin de soustraire les acquisitions "on-resonance" de celles "off-resonance".

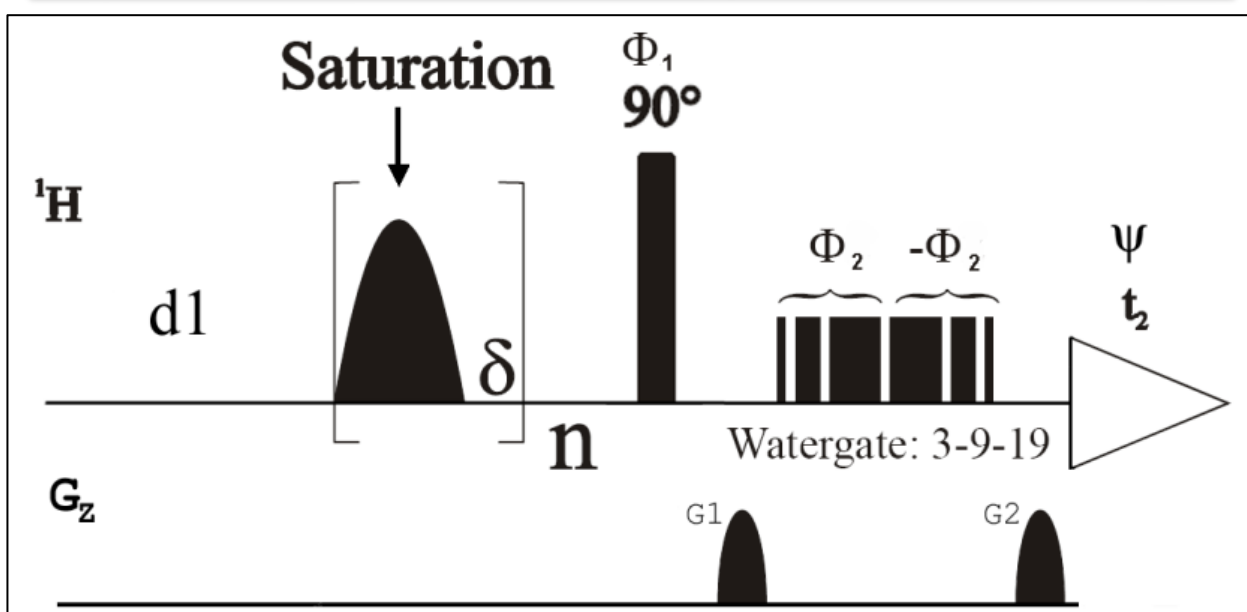


Figure 42 : Schéma de la séquence RMN d'impulsion STD 1D WATERGATE. Les phases sont  $F1 = \{x, -x\}$ ,  $F2 = \{x, x, y, y, -x, -x, -y, -y\}$ ,  $F = \{x, x, -x, -x\}$ . D'après Mayer et al 2001 [172].

L'étape de saturation peut s'effectuer de diverses manières, et son efficacité est liée à la fois à la durée, la sélectivité en fréquence et la puissance de la radiofréquence d'irradiation. Pour le choix des fréquences, les peptides et les tanins ayant des spectres bien caractéristiques, il est possible de saturer les protons de la protéine (à 0,5 ppm) sans perturber ceux du tanin. Pour l'enregistrement du spectre off résonance (sans saturation), une fréquence de + 30 ppm a été choisie, ce qui permet d'irradier sans affecter la protéine ni son ligand.

Le type d'impulsion utilisé pour la saturation constitue également un paramètre important à prendre en compte. Pour notre étude, des impulsions de type gaussienne ont été choisies. Elles permettent une bonne sélectivité en fréquence et leur faible sensibilité aux inhomogénéités de champ magnétique permet d'obtenir des impulsions sélectives de longue durée.

Parmi les différents paramètres expérimentaux relatifs à la saturation, l'un d'entre eux a fait l'objet d'une certaine optimisation du délai de relaxation (égal au temps d'acquisition  $Aq$  + le délai de relaxation  $d1$ ). L'allongement du délai  $d1$  de 0.1 à 2 s a permis une meilleure relaxation des signaux avant un nouveau cycle de saturation, se traduisant par une meilleure élimination des signaux de l'eau et des impuretés sur le spectre 1D. En revanche, ceci se traduit également par un allongement de la durée des expériences STD.

## 4. Expérience HRMAS

L'utilisation d'une sonde HRMAS (High Resolution Magic Angle Spining) a plusieurs intérêts. En effet les échantillons que nous avons étudiés peuvent se retrouver sous forme colloïdale, de par la nature colloïdale des tanins et la formation de complexes tanins-protéines susceptibles de former des agrégats solides.

La HRMAS est une technique RMN développée, à l'origine, pour la RMN du solide par E.R. Andrew [176]. En effet, dans le cas des solides, il existe des interactions anisotropes supplémentaires tels que le couplage dipolaire, et l'anisotropie de déplacement chimique. Ces interactions ne jouent aucun rôle dans le cas d'une solution car elles sont moyennées à 0 sous l'effet du mouvement brownien. Mais dans le cas des solides, leur forte intensité peut masquer complètement les informations anisotropes habituellement recherchées comme le déplacement chimique et le couplage scalaire. Le couplage dipolaire correspond à une interaction directe entre les dipôles magnétiques, à travers l'espace. Son intensité est inversement proportionnelle au cube de la distance entre les noyaux. Ainsi, de par la proximité entre noyaux au sein d'un solide, cette interaction devient donc prépondérante et conduit à une distribution large de déplacements chimiques qui élargit les raies.

Dans notre cas, les agrégats colloïdaux ont des mouvements beaucoup plus lents que les molécules isolées en solution. De cette manière le blindage électronique devenant anisotrope et le couplage spin-spin direct provoquent l'élargissement des raies de résonance. Toutes les interactions ont au premier ordre une loi d'échelle en  $\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2}$ , ce terme s'annulant pour un angle  $\theta$  de  $54,7^\circ$  par rapport au champ magnétique  $B_0$ . Cet angle spécifique est appelé l'angle magique (Magic Angle Spinning, MAS) (Figure 43).

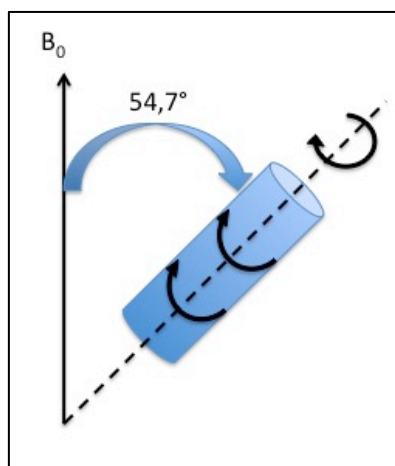


Figure 43 : Positionnement du rotor à l'angle magique

Ainsi, le principe de cette technique HRMAS consiste à placer l'échantillon en rotation à l'angle magique de  $54,7^\circ$  afin d'éliminer les potentielles interactions dipolaires pouvant apparaître sur des solutions à la frontière entre le liquide et le solide. Les interactions magnétiques internes anisotropes sont alors généralement moyennées à condition que la vitesse de rotation de l'échantillon soit suffisamment rapide (généralement entre 1 et 10 kHz). Le spectre obtenu en rotation est donc proche d'un spectre liquide haute résolution, l'échantillon restant à l'état solide ou aggrégé.

Les séquences RMN employées dans le cadre des expériences HRMAS restent identiques à celles utilisées en RMN liquide classique. Seule la rotation et l'orientation à l'angle magique sont ajoutées.

Dans notre cas, les spectres HRMAS proton ont été réalisés sur un spectromètre 600 MHz dans des conditions strictement identiques à l'acquisition des spectres proton en RMN liquide classique.

**CHAPITRE IV :**  
**EFFET DES SUCRES SUR LE**  
**COMPORTEMENT COLLOIDAL DES**  
**TANINS**

La première étape de cette étude a consisté à étudier l'impact de la présence de sucres en solution sur le comportement colloïdal des tanins. En effet, les tanins de la famille des procyanidines sont connus pour s'auto-associer, l'auto-association pouvant être caractérisée par deux paramètres physicochimiques, la concentration à partir de laquelle ils existent majoritairement sous la forme de colloïdes (CMC) et la constante d'association avec laquelle les procyanidines s'auto-associent,  $K_a$  [87].

Dans un premier temps, la RMN a permis de mesurer et de comparer ces deux paramètres - CMC et  $K_a$  - d'un polyphénol modèle, l'EGCG, mais aussi de faire une analyse quantitative, en présence et en absence de différents sucres. Les sucres utilisés sont classés en sucres simples (glycérol et glucose) et polysaccharides (pectine et gomme arabique).

## A- Partie Expérimentale

### 1. Matériels

L'EGCG, le glucose, le glycérol, la gomme arabique et la pectine utilisés dans ces études proviennent de Sigma Aldrich. Les solvants deutérés D<sub>2</sub>O et Ethanol-D<sub>6</sub> proviennent de chez Euriso-top.

### 2. Préparation des échantillons

#### a. Solution tampon utilisée

Les différents échantillons ont été dissous dans un tampon mimant le vin (Tp Vin), c'est à dire dans un mélange composé d'eau à 88% (dont 20% à 100% de D<sub>2</sub>O pour l'enregistrement des spectres RMN), 12% d'éthanol (v/v) et 5 mM d'acide acétique deutéré de façon à obtenir un pH proche de 3.5.

#### b. Préparation des échantillons

##### i. Titration de l'EGCG

La titration de l'EGCG a été réalisée sur une gamme de 14 échantillons de tanins dans des concentrations allant de 0,5 à 25 mM (0,5 ; 1 ; 3,5 ; 5 ; 7,5 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12,5 ; 15 ; 17,5 ; 20 ; 22,5 ; 25) en absence de sucre (servant de contrôle), ou en présence de sucre avec 5,6 mM de glucose, ou 0,1 mM de glycérol, ou 1,3 µM de Gomme arabique ou encore 10 µM de pectine. Ces concentrations de sucre ont été choisies par rapport aux concentrations qui sont actuellement trouvées dans les vins (cf. chapitre I-E).

##### ii. Titration de la Gomme arabique

La titration de la Gomme arabique a été réalisée sur une gamme de 10 échantillons allant de 0 à 2,5 µM (0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 1,3, 1,7; 2,1 ; 2,5) en présence de 1 mM ou 10 mM d'EGCG.



### 3. Enregistrement des spectres RMN

Les spectres ont été enregistrés sur différents appareils : 600 MHz AVIII Bruker (au sein du Cesamo), 700 MHz AVII Bruker (au sein de l'IECB). Différentes sondes ont été utilisées en fonction des expériences : HR MAS, TXI et BBO.

Trois types d'expériences RMN ont été réalisées pour chaque échantillon. L'ensemble des déplacements chimiques des protons sont donnés en utilisant comme référence interne l'éthanol deutéré présent dans le milieu Vin employé, référence ayant également servi pour la normalisation des données quantitatives.

#### a. Spectres proton

Les spectres protons 1D ont été enregistrés à 700 MHz avec une sonde TXI à l'aide d'une séquence watergate permettant la suppression du signal de l'eau [177]. Les paramètres ayant été utilisés pour ces expériences sont les suivants: une fenêtre spectrale de 12 ppm, une impulsion à 90° de 6,90  $\mu$ s, une impulsion pour la séquence watergate de 9  $\mu$ s ; un temps de recyclage de 5 s incluant 3 s de temps d'acquisition et 2 s de délai de relaxation.

#### b. Spectres DOSY

Les mesures de coefficients de diffusion ont été obtenues en utilisant une séquence de type DOSYPGSE [170] : Cette séquence d'impulsions correspond à une expérience d'écho de spin (Hahn-echo) à laquelle ont été ajoutés deux gradients G, de même intensité et de même durée, insérés lors des deux périodes d'écho,  $\tau$ . Les paramètres ayant été utilisés pour cette séquence sont les suivants : une fenêtre spectrale de 12 ppm ; un nombre de scans de 128 ; un temps de recyclage de 2 s ; un délai intergradients  $\Delta$  de 200 ms ; une durée de gradient  $\delta$ , de 3 ms. La puissance des gradients a été paramétrée de façon à obtenir une variation linéaire de 2 à 95% du maximum de leur puissance en 16 étapes.

Le coefficient de diffusion D a ensuite été obtenu par intégration de l'intensité du signal dans une zone de résonance spécifique de la région des groupements NH amides des acides aminés en fonction de la puissance des gradients appliqués en utilisant l'équation [III-D<sub>4</sub>] [170]:

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -[\gamma^2 \times \delta^2 \times G_z^2 \times (\Delta - \delta/3)] D \quad \text{[III-D}_4\text{]}$$

Le coefficient de diffusion est alors utilisé à la fois pour déterminer la constante d'auto-association  $K_a$  et la CMC de l'EGCG, ainsi que pour calculer le rayon hydrodynamique  $R_H$  à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein [III-D<sub>1</sub>]:

$$D = k_B T / (6\pi\eta R_H) \quad \text{[III-D}_1\text{]}$$

On remarque sur cette équation que la viscosité du milieu présente un impact important sur le calcul du  $R_H$ .

### c. Spectres HRMAS

Les spectres HRMAS ont été réalisés à 600MHz à l'aide d'une séquence watergate permettant la suppression du signal de l'eau, sur un échantillon d'EGCG à 10 mM en absence puis en présence de 42  $\mu$ M de gomme arabique.

Les paramètres ayant été utilisés pour ces expériences sont les suivants : une fenêtre spectrale de 12 ppm, une impulsion à 90° de 6,90  $\mu$ s, une impulsion pour le watergate de 9  $\mu$ s, un temps de recyclage de 5 s incluant 3 s de temps d'acquisition, 2 s de délai de relaxation, et une vitesse de rotation à l'angle magique de 5000 Hz.

Le traitement des données et leur analyse ont été réalisés en utilisant le programme Topspin version 2.1 de la société Bruker.

## 4. Mesure de viscosité

Les mesures de viscosité des différents échantillons de tanins en présence de sucre ou non ont été réalisées sur un viscosimètre à bille roulante Lovis 2000 M/ME (Anton Parr, Les Ulis, France). L'appareil réalise 5 mesures sur le même échantillon et donne une moyenne des 5 valeurs obtenues. Cette série de mesures a été réalisée 5 fois pour chacun des échantillons donnant ainsi une moyenne et un écart-type sur 25 mesures distinctes.

## 5. Mesure de diffusion dynamique de la lumière

Les mesures de DLS (Dynamic Light Scattering) ont été réalisées sur un appareil Zetasizer (MALVERN) avec mesure de la diffusion à angle fixe à 90°.

Un échantillon de gomme arabique à 2,5  $\mu$ M solubilisé en tampon vin a été préparé et la taille des particules a été mesurée en absence et en présence d'EGCG entre 0 et 10 mM.

## B-Influence des sucres sur le comportement colloïdal de l'EGCG

Dans cette première partie, nous avons observé l'influence de certains sucres simples et polysaccharides sur deux paramètres liés au comportement colloïdal des tanins : la constante d'auto-association ( $K_a$ ) et la Concentration Micellaire Critique (CMC).

En effet, lors de l'augmentation de la concentration de tanins en solution, ces derniers forment des colloïdes aboutissant à la formation de micelle au-delà de la CMC (Figure 44). Ce phénomène d'auto-association a été décrit par Baxter *et al.* sous la forme d'un modèle isodesmique ou plusieurs tanins peuvent successivement s'auto-associer avec une constante d'auto-association identique à chaque étape (cf. chapitre III-C1 b.ii.) (Figure 44) [86, 178].

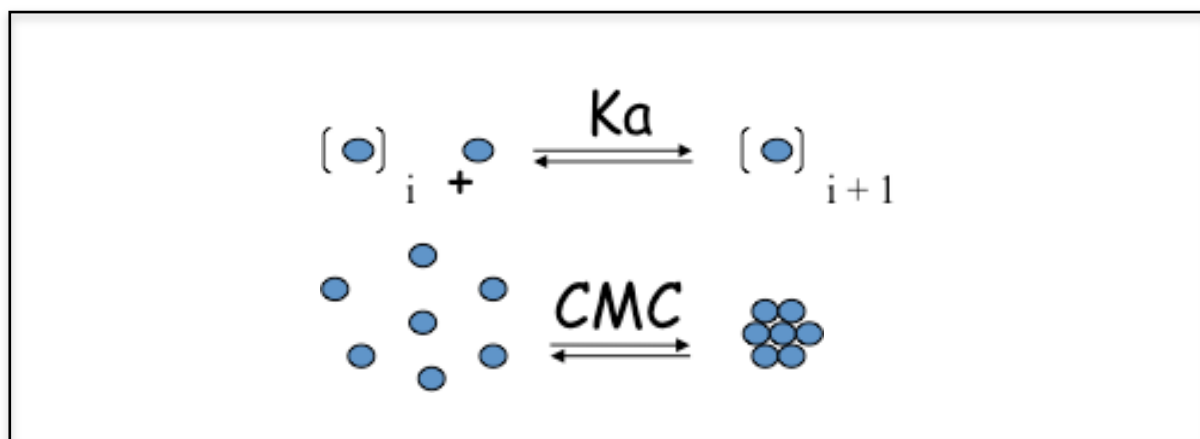


Figure 44 : Modèle isodesmique d'auto-association des tanins. Avec  $K_a$  la constante d'auto-association et  $CMC$  la Concentration Micellaire Critique. Adapté de Pianet *et al.* 2008 [87].

Une série de titrations de l'EGCG entre 0,5 et 25 mM a donc été réalisée en présence et en absence de différents sucres.

Deux types d'expériences ont été enregistrés : d'une part des spectres proton 1D nous permettant d'observer les variations de déplacement chimique au fur et à mesure de l'ajout de tanins ; et d'autre part, des spectres DOSY nous permettant d'obtenir des coefficients de diffusion et de suivre leur évolution au cours de la titration.

Ces expériences permettent ainsi de calculer deux paramètres essentiels :  $K_a$  et  $CMC$

## 1. Mesure des constantes d'association

L'auto-association de l'EGCG a été suivie par l'analyse des variations de  $\delta$  ou  $D$  lors de la titration de l'EGCG. Dans ces deux cas, l'équation suivante tirée du modèle isodesmique, permet d'obtenir la valeur de la constante d'auto-association  $K_a$  [86, 87] (cf. chapitre III-C1 et 2):

$$\Delta A = |A_{obs} - A_{libre}| = (A_{micelle} - A_{libre})K_a[C_0] \left\{ \frac{2}{1+(K_a[C_0]+1)^{1/2}} \right\}^2 \quad [IV-B1]$$

Où  $A_{obs}$  représente, selon ce que l'on observe, le déplacement chimique  $\delta_H$  ou le coefficient de diffusion  $D$  ;  $A_{libre}$  représente le déplacement chimique ou le coefficient de diffusion des molécules non associées ;  $A_{micelle}$ , représente le  $\delta_H$  ou le coefficient de diffusion des molécules engagées dans une micelle  $C_0$  la concentration totale en tanin.

### a. Suivi du déplacement chimique

L'étude des variations de déplacements chimiques est un bon outil permettant de mettre en évidence et de suivre de subtiles variations d'environnement d'une molécule, et particulièrement lors de son auto-association. Ce phénomène a déjà été utilisé dans divers modèles d'étude de tanins [86, 87].

Dans le cas de l'EGCG, les spectres protons enregistrés aux différentes concentrations de la titration mettent en évidence des déplacements chimiques très sensibles aux variations de concentrations en EGCG pour certains protons spécifiques tels que les protons des cycles aromatiques ( $H_6$ ,  $H_8$ ,  $H_2'H_6'$ , et  $H_2''H_6''$ ) (Figure 45). Ces déplacements chimiques mettent en évidence un effet de blindage de ces protons typique d'une association des polyphénols par un phénomène de  $\pi$ -stacking [64].

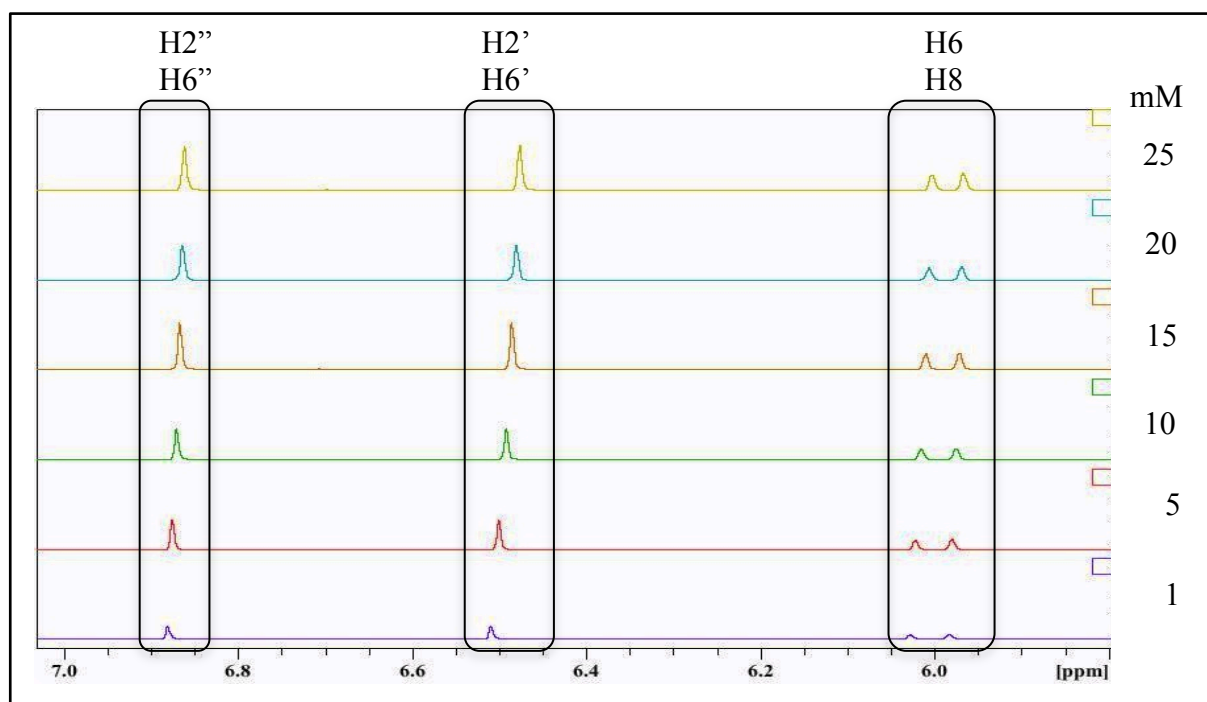


Figure 45 : Déplacement chimique des protons H2''H6'', H2'H6', H6 et H8 de l'EGCG (structure p16) en fonction de la concentration en EGCG.

Le paramétrage des points expérimentaux à partir de l'équation IV-B1, reflétant les variations théoriques observables dans le cadre d'un modèle isodesmique, permet ainsi de remonter à la constante d'association  $K_a$ . Ce paramétrage est effectué par l'ajustement des variables  $\Delta_{\delta_{\max}}$  et  $K_a$  de telle sorte que la différence entre les points expérimentaux (symboles) et les points théoriques (courbe) soit la plus petite possible (Figure 46).

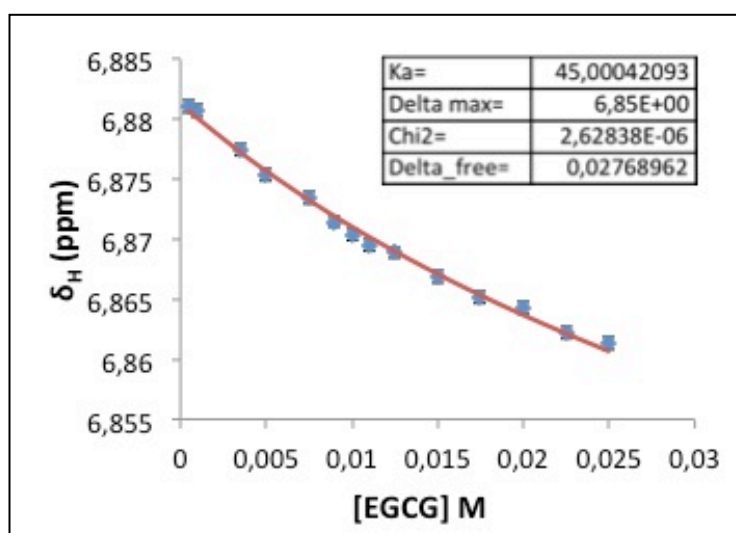


Figure 46: Variation des déplacements chimiques de l'EGCG au cours de sa titration en présence de 1,3  $\mu\text{M}$  de gomme arabique. Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation IV-B1 permet d'accéder au  $K_a$  (paramètres dans l'encart). La valeur de  $K_a$  est donnée à  $\pm 6 \text{ M}^{-1}$ .

### b. Mesure et suivi des coefficients de diffusion

La mesure du coefficient de diffusion a été réalisée à partir d'expériences de RMN de type DOSY, pour chaque concentration en EGCG, au cours de sa titration en absence ou présence de sucres.

Le coefficient de diffusion transversale  $D$  mesuré par ces expériences est inversement proportionnel à la taille de l'objet moléculaire observé, et suit la relation de Stokes-Einstein (Equation [III-C2<sub>1</sub>]). En effet comme le montre la figure 47,  $D$  diminue lorsque la concentration en tanin augmente.

Cette variation de  $D$  peut également être lissée à partir de la même équation que celle utilisée pour suivre les variations de déplacements chimiques (Equation [IV-B1]). Le paramétrage est effectué par l'ajustement des variables  $\Delta_{Dmax}$  et  $K_a$  de telle sorte que la différence entre les points expérimentaux (symboles) et les points théoriques (courbe) soit la plus petite possible (Figure 47).

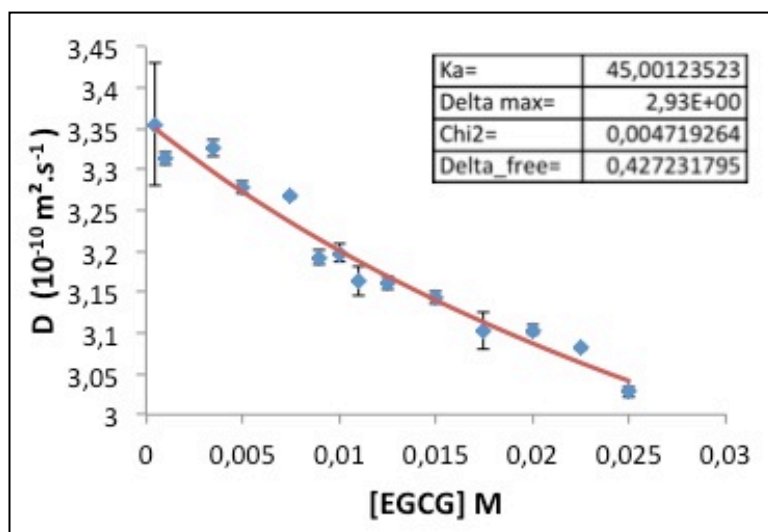


Figure 47 : Variation des coefficients de diffusion  $D$  de l'EGCG au cours de sa titration en présence de 1,3  $\mu\text{M}$  de gomme arabique. Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation IV-B1 permet d'accéder au  $K_a$  (paramètres dans l'encart). La valeur de  $K_a$  est donnée à  $\pm 6 \text{ M}^{-1}$ .

### c. Valeurs des différentes constantes d'association obtenues

La modélisation des déplacements chimiques et des coefficients de diffusion à l'aide de l'équation IV-B1 montre dans les deux cas qu'une mesure de la constante d'association  $K_a$  peut être obtenue avec une bonne précision.

Ainsi, les valeurs de  $K_a$  de l'EGCG en présence des différents sucres ont été mesurées pour différents protons des hétérocycliques H6, H8, H2'H6' et H2"H6". La moyenne obtenue en présence de chaque sucre est donnée dans le tableau 4 et montre clairement qu'aux concentrations de sucre utilisées, aucune modification des  $K_a$  n'est observée ( $\approx 45\text{M}^{-1}$ ), dans les limites de l'erreur expérimentale.

		EGCG	+ 5,6 mM glucose	+ 0,1 mM glycérol	+ 10 $\mu\text{M}$ pectine	+ 1,3 $\mu\text{M}$ gomme arabique
<b>D<sub>2</sub>O</b>	<b><math>K_a (\text{M}^{-1}) \pm 5</math></b>	44	48	46	ND	ND
<b>Tp Vin</b>	<b><math>K_a (\text{M}^{-1}) \pm 6</math></b>	42	45	45	44	47

Tableau 4 : Valeurs des constantes d'auto-association ( $K_a$ ) mesurées pour l'EGCG lors de sa titration en D<sub>2</sub>O ou Tp Vin en présence de différents sucres. ND : non déterminé

## 2. Mesure des concentrations micellaires critiques

La mesure des déplacements chimiques et des coefficients de diffusion aux différentes concentrations en EGCG lors de sa titration permet également de mesurer la CMC, correspondant à la concentration au-delà de laquelle les tanins s'auto-organisent en pseudo-micelles.

La figure 48 A présente la variation du déplacement chimique des protons H2'H6' en fonction de l'inverse de la concentration en tanins. Cette représentation permet de mesurer la valeur CMC [92] : au point d'intersection de deux droites, l'une correspondant à la tangente des points obtenus aux plus fortes concentrations d'EGCG et l'autre à la valeur de déplacement chimique de l'EGCG libre de toute association. Le même type de profil est obtenu en observant l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de l'inverse de la concentration (Figure 48 B).

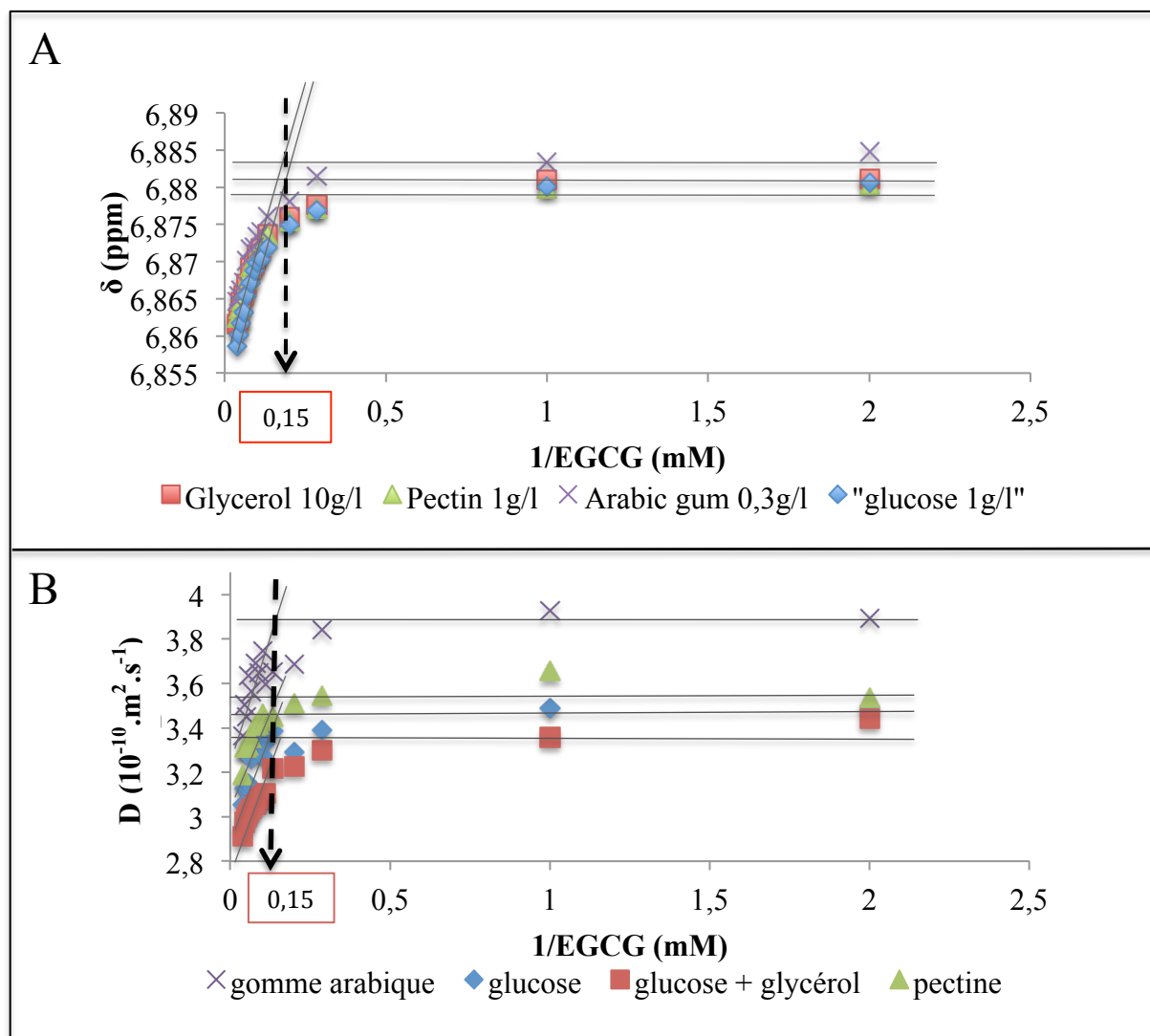


Figure 48 : Variation du déplacement chimique des protons  $H2'H6$  de l'EGCG entre 0 et 25 mM en présence de glucose, glycérol, gomme arabique et pectine, en fonction de l'inverse de la concentration en EGCG (A). Courbes des valeurs de coefficient de diffusion des protons  $H2'H6$  de l'EGCG entre 0 et 25 mM en présence de glucose, glycérol, gomme arabique et pectine, en fonction de l'inverse de la concentration en EGCG (B). L'intersection entre la pente initiale et la droite au plateau donne la valeur de la CMC.

La présence de sucres, quels qu'ils soient, ne semble modifier ni l'allure des droites, ni leur point d'intersection, ni même la valeur « plateau ».

L'ensemble des valeurs de CMC obtenues pour chaque sucre est présenté dans le tableau 5. Ces valeurs de CMC ne présentent pas de différences significatives en présence de sucre, et sont autour de 9 mM, dans la limite de l'erreur expérimentale.



		EGCG	+ 5,6 mM glucose	+ 0,1 mM glycérol	+ 10 $\mu$ M pectine	+ 1,3 $\mu$ M gomme arabique
<b>D<sub>2</sub>O</b>	<b>CMC (mM) <math>\pm</math> 2</b>	6	7	7	ND	ND
<b>Tp Vin</b>	<b>CMC (mM) <math>\pm</math> 2</b>	10	9	9	8	8

Tableau 5 : Valeurs de CMC obtenues pour l'EGCG lors de sa titration en D<sub>2</sub>O ou Tp Vin en présence de différents sucres. ND : non déterminé

### 3. Mesure de la taille des micelles

Un dernier paramètre nous renseignant sur le comportement colloïdal du tanin étudié est la taille des micelles formées lors de la complexation au-delà de la valeur de CMC. Le paramètre physique permettant de refléter cette taille est le rayon hydrodynamique ( $R_H$ ) qui peut être calculé à partir des coefficients de diffusion grâce à la relation de Stokes-Einstein (Equation [III-C2<sub>1</sub>]).

La figure 47 (p.90) met clairement en évidence une baisse des coefficients de diffusion lorsque la concentration en EGCG augmente, suggérant que les molécules s'organisent en micelles. Pour les concentrations les plus faibles, la valeur de D atteint une valeur correspondant à la molécule sous sa forme libre ( $D_{\text{libre}}$ ) alors que pour les plus fortes concentrations, la valeur de D correspond à la molécule engagée dans une micelle. Cette valeur évolue théoriquement jusqu'à un plateau (non atteint dans cette expérience) correspondant à une valeur D minimale appelée  $D_{\text{micelle}}$ . Cette valeur peut être calculée à partir de la relation entre D et les concentrations en tanins en utilisant l'équation IV-B1, et est utilisée pour évaluer les tailles moyennes des micelles grâce à l'équation de Stokes-Einstein (cf. équation [III-C2<sub>1</sub>]).

D'autre part, cette équation dépend également de la viscosité du milieu qui présente un impact important sur le calcul du  $R_H$ . Ainsi, pour pouvoir calculer ces  $R_H$  avec précision, des mesures de viscosité ont été réalisées sur une solution tampon mimant le vin, en présence des

concentrations utilisées des différents sucres étudiés. Les valeurs obtenues pour chaque milieu tampon utilisé sont données dans le tableau 6 suivant :

		<b>Tp Vin</b>	<b>Tp Vin + 5,6 mM glucose</b>	<b>Tp Vin + 0,1 mM glycérol</b>	<b>Tp Vin + 10 µM pectine</b>	<b>Tp Vin +1,3 µM gomme arabique</b>
<b>Viscosité (Pa.s)</b>	<b>Moyenne</b>	1,277	1,3800	1,3560	2,080	1,285
	<b>Ecart-type</b>	0,005	0,0006	0,0006	0,001	0,007

Tableau 6 : Valeur de viscosité du milieu tampon en fonction des concentrations en différents sucres étudiés. Les mesures sont répétées 5 fois par échantillon avec un set de 5 mesures réalisé à chaque fois par l'appareil, soit une moyenne finale sur 25 mesures.

Les valeurs de  $R_H$  des micelles formées au niveau de la CMC, ainsi calculées à partir des coefficients de diffusion et des valeurs de viscosité, sont répertoriées dans le tableau 7.

	<b>EGCG</b>	<b>+ 5,6 mM glucose</b>	<b>+ 0,1 mM glycérol</b>	<b>+ 10 µM pectine</b>	<b>+ 1,3 µM gomme arabique</b>
<b><math>D_{micelle}</math> (<math>10^{-10} m^2.s^{-1}</math>)</b>	3,05	2,60	2,51	2,25	2,85
<b><math>\eta</math> (mPa.s)</b>	1,277	1,380	1,356	2,080	1,285
<b><math>R_H</math> micelles (nm) <math>\pm 0,9</math></b>	5,6	6,1	6,4	4,7	5,9

Tableau 7 : Valeurs calculées des  $R_H$  des micelles d'EGCG formées en Tp Vin en présence de différents sucres. Les calculs sont réalisés à l'aide de l'équation de Stokes Einstein (Equation [III-C2]) en tenant compte de la viscosité du milieu et de  $D_{micelle}$ .

Ces résultats mettent en évidence des tailles de micelles, mesurables en RMN liquide, identiques dans l'erreur expérimentale en présence ou en absence des différents sucres testés avec une valeur située autour de 5,5 nm dans un milieu Vin.

#### 4. Bilan sur l'effet des sucres testés en solution

L'ensemble des paramètres mesurés ou calculés précédemment est résumé dans le tableau 8 suivant :

EGCG	D <sub>2</sub> O			Tp Vin		
	CMC ± 2 mM	Ka ± 5 M <sup>-1</sup>	R <sub>H</sub> micelles ± 0,9 nm	CMC ± 2 mM	Ka ± 5 M <sup>-1</sup>	R <sub>H</sub> micelles ± 0,9 nm
seule	6	44	9	10	39	5,6
+ 5,6 mM glucose	7	48	7,7	9	45	6,1
+ 0,1 mM glycérol	7	46	7,4	9	45	6,4
+ 10 µM pectine				8	44	4,7
+ 1,3 µM gomme arabique				8	47	5,9

Tableau 8 : Valeur de CMC, Ka et R<sub>H</sub> de l'EGCG en présence ou non de sucres.

Au regard de l'ensemble de ces résultats, les valeurs de CMC, de Ka et Rh obtenues à partir d'analyses expérimentales en RMN liquide ne présentent pas de variation significative en présence de sucre dans le milieu. Les valeurs obtenues sont similaires à celles obtenues précédemment en absence de sucre par Fabre *et al.* [92].

Cependant, une analyse plus fine des spectres met en évidence que lors de la titration de l'EGCG, les signaux des protons des différents sucres étudiés présentent un léger blindage (gomme arabique, pectine) ou déblindage (glucose, glycérol) et diminuent tous en intensité (Figure 49), laissant suggérer que les mesures ont été réalisées seulement sur la partie soluble d'EGCG/sucre.

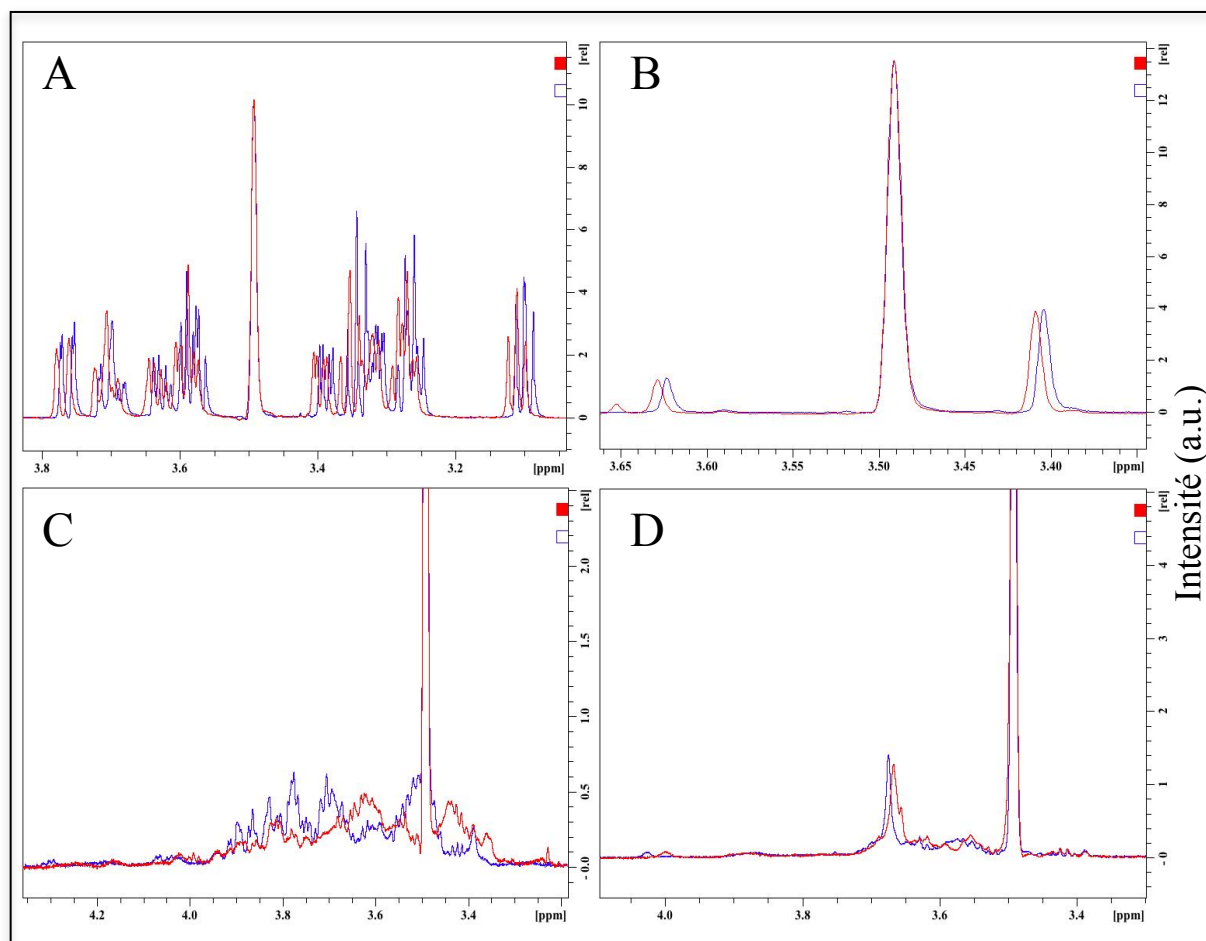


Figure 49 : Ensemble de massifs représentatif des signaux spécifiques des sucres (A : glucose, B : glycérol, C : gomme arabique, D : pectine) mettant en évidence une baisse de l'aire des signaux entre 1 mM (bleu) et 25 mM (rouge) en EGCG. Le pic à 3,5 ppm correspond à l'éthanol, les autres pics correspondent aux signaux propres à chaque sucre.

En effet, cette observation suggère qu'une partie du signal n'est plus visible car en échange plus lent avec le signal observé. Ainsi, une interaction pourrait bien s'effectuer entre l'EGCG et les sucres et provoquer une formation de complexes de taille suffisamment importante ( $R_H > 15$  nm) pour ne pas être détectés en RMN liquide mais pas trop ( $R_H < 1$   $\mu$ m) puisque la solution ne présente ni précipité, ni trouble.

Ce cas de disparition de signal a déjà été observé dans le cadre d'analyses de SUVs (Small Unilamellar Vesicles) chargées en cholestérol qui ne présentaient pas de signal visible en RMN liquide classique à cause de l'apparition de couplages dipolaires (interactions de type

solide) [179]. Dans cette étude Mouret *et al* mettent en évidence la possibilité de récupérer ce signal en utilisant la RMN HRMAS afin d'éliminer le couplage dipolaire étant à l'origine de cette perte de signal.

Ainsi, dans notre cas, une étude par RMN HRMAS a été réalisée afin d'observer si une rotation à l'angle magique pouvait permettre également de récupérer le signal perdu qui correspondrait aux colloïdes formés entre sucres et tanins.

## C-Expériences HRMAS

Lors d'expériences de titration en gomme arabique sur une concentration fixe en EGCG (10 mM), une baisse similaire du signal des protons de cette procyanidine est visible (Figure 50 spectres bleu et rouge). De plus les signaux des protons des cycles aromatiques de l'EGCG (H6, H8, H2'H6' et H2''H6'') sont bien isolés et facilement intégrables pour réaliser des études quantitatives.

Ainsi, afin de confirmer la présence de colloïdes, une expérience en 3 étapes a été réalisée :

Tout d'abord, un tube avec 10 mM d'EGCG a été préparé en tampon Vin et son spectre proton a été enregistré à la fois en RMN des liquides et en HRMAS (le spectre HRMAS servant de contrôle et de normalisation pour les quantifications sur les données HRMAS).

Dans un second temps 42  $\mu$ M de gomme arabique ont été ajoutés à la solution et un nouveau spectre proton en RMN des liquides a été acquis afin de pouvoir quantifier la baisse du signal de l'EGCG lié à l'interaction tanin-sucre.

Puis dans un troisième temps, un spectre HRMAS de ce mélange EGCG-gomme arabique, en rotation à 5000 Hz, a été enregistré afin de quantifier à nouveau le signal de l'EGCG et d'observer si la rotation permettait de récupérer la totalité ou une partie du signal du tanin et ainsi confirmer la présence de colloïdes (Figure 50).

L'ensemble des spectres HRMAS a été enregistré avec une vitesse de rotation de 5000 Hz et avec l'utilisation des mêmes séquences et mêmes paramètres que ceux employés pour enregistrer les spectres proton 1D.

L'observation des spectres met en évidence une baisse du signal des différentes résonances de l'EGCG avec un élargissement des raies en RMN liquide après ajout de la gomme arabique, alors que l'on retrouve en HRMAS un spectre plus fin et plus intense. L'analyse quantitative de ces différents spectres a été réalisée par intégration des résonances de l'EGCG, et met en évidence, une baisse du signal de l'EGCG de plus de 20% en RMN liquide après ajout de la gomme arabique, mais qui est retrouvé en totalité en HRMAS (Figure 51).

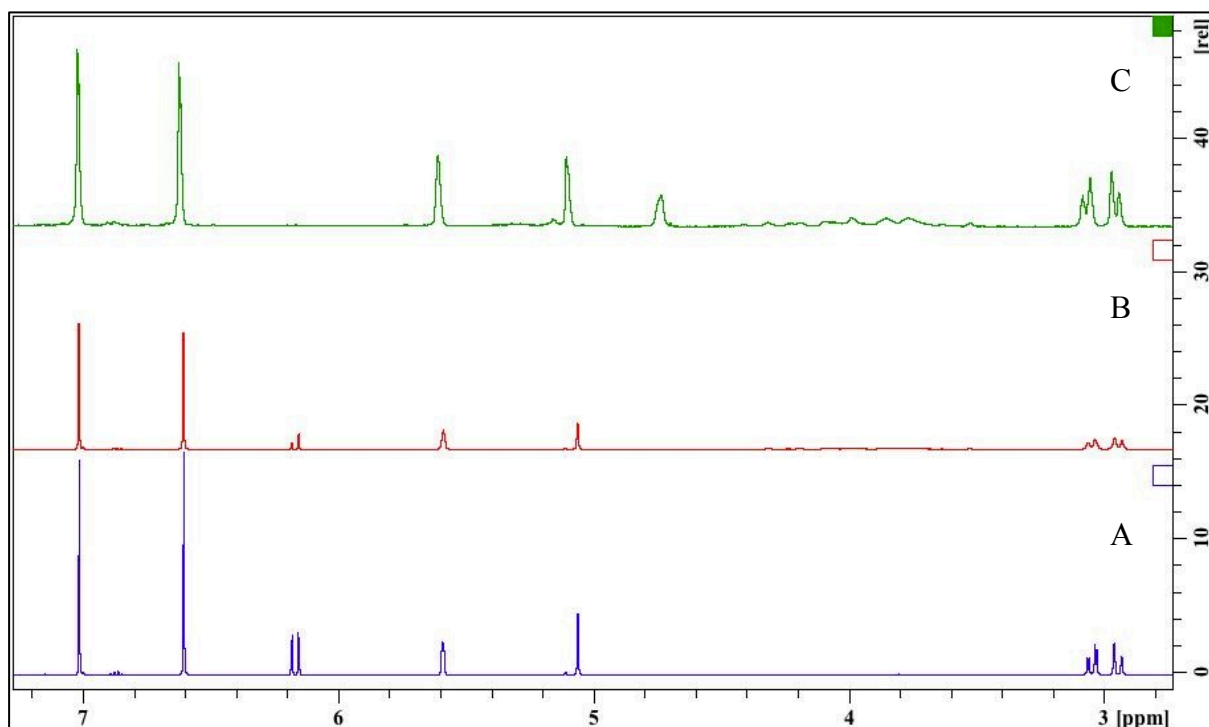


Figure 50 : Analyse des complexes colloïdaux tanins-sucre, en bleu est représenté le spectre proton en RMN liquide de l'EGCG seul à 10 mM en tampon vin (A), en rouge le spectre proton en RMN liquide de l'EGCG après ajout de 42  $\mu\text{M}$  de gomme arabique (B) et en vert le spectre HRMAS à 5000 Hz de l'EGCG après ajout de 42  $\mu\text{M}$  de gomme arabique (C). L'ensemble des spectres est normalisé à l'aide du signal du TMS utilisé en tant que référence interne.

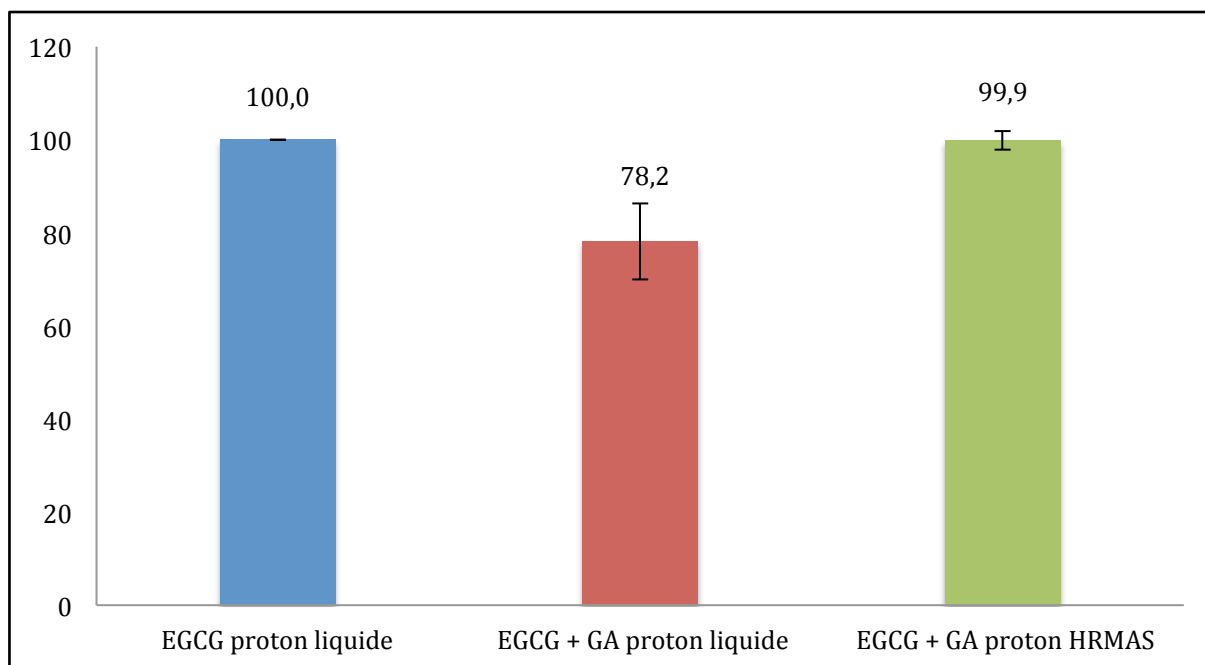


Figure 51 : Histogramme du pourcentage de signal de l'EGCG à 10 mM détectable, avant (en bleu) et après ajout de 42  $\mu\text{M}$  de gomme arabique mesurée en RMN proton liquide et HRMAS (respectivement rouge et vert).

Ce phénomène est en accord avec la formation d'un complexe colloïdal tanins-sucres dont la taille ne permet pas d'observer les signaux en RMN des liquides, mais que l'on peut retrouver avec une rotation de 5000 Hz à l'angle magique, conditions expérimentales qui permettent la suppression des couplages dipolaires [179].

La baisse des signaux observable lors des différentes titrations en sucre ou en EGCG peut donc être directement reliée à l'interaction entre tanins et sucres et à la formation de complexes colloïdaux. Ainsi une étude de ces différents signaux a été réalisée afin de confirmer et caractériser cette interaction.



## D- Titration de l'EGCG : analyse des signaux des sucres

Dans cette étude, nous sommes partis des quatre mêmes titrations de l'EGCG, que celles étudiées dans le chapitre IV-A, entre 0 et 25 mM en présence de sucres (5,56 mM de glucose, 0,1 mM de glycérol, 1,3  $\mu$ M de gomme arabique ou 10  $\mu$ M de pectine). Ces titrations en présence de sucres ont permis d'observer l'impact de l'ajout de tanins sur les signaux des sucres. Pour cela, une analyse de l'intensité des signaux des protons propres à chaque sucre a été réalisée.

### 1. Analyses quantitatives des signaux

Dans cette étude, les intégrations ont été normalisées par rapport au signal proton résiduel ( $\text{CHD}_2$  résonnant à 1 ppm) de l'éthanol deutéré. Cela a permis de quantifier les sucres ou les tanins tout au long de la titration. La valeur de ces intégrales est exprimée en %, avec pour signal maximum à 100% la valeur de l'aire du sucre en absence de tanins.

Ainsi, pour l'ensemble des titrations de l'EGCG en présence de glucose, gomme arabique et pectine, l'intégration des pics spécifiques de chaque sucre a été réalisée. Pour cela, les intégrales ont été mesurées, entre 3,8 et 3,55 ppm ainsi que 3,45 et 3,2 ppm pour le glucose (ensemble des protons de la structure), entre 3,65 et 3,63 pour le glycérol (protons H3 et H6), entre 4,3 et 3,55 ppm pour la gomme arabique (protons H2 à H6', H5 et H1 axial de la chaîne principale et résonances des protons des chaînes latérales), et entre 4,2 et 3,6 ppm pour la pectine (contenant les signaux des protons H1, H2, H4, H5 des unités d'acide galacturonique ainsi que des résonances des protons des chaînes latérales) (cf. Figure 49 chapitre IV-B4).

La mesure de ces intégrales au cours de la titration en EGCG pour chaque sucre permet ainsi de mettre en évidence une diminution de la quantité de sucres en solution au cours de l'addition de l'EGCG (Figure 52). Cette baisse plus ou moins importante est visible pour chaque sucre aux concentrations étudiées.

Ces baisses de signal atteignent jusqu'à 10% pour le glucose et le glycérol, 30% pour la pectine et 55% pour la gomme arabique avec une erreur expérimentale sur la mesure de  $\pm 3\%$ .

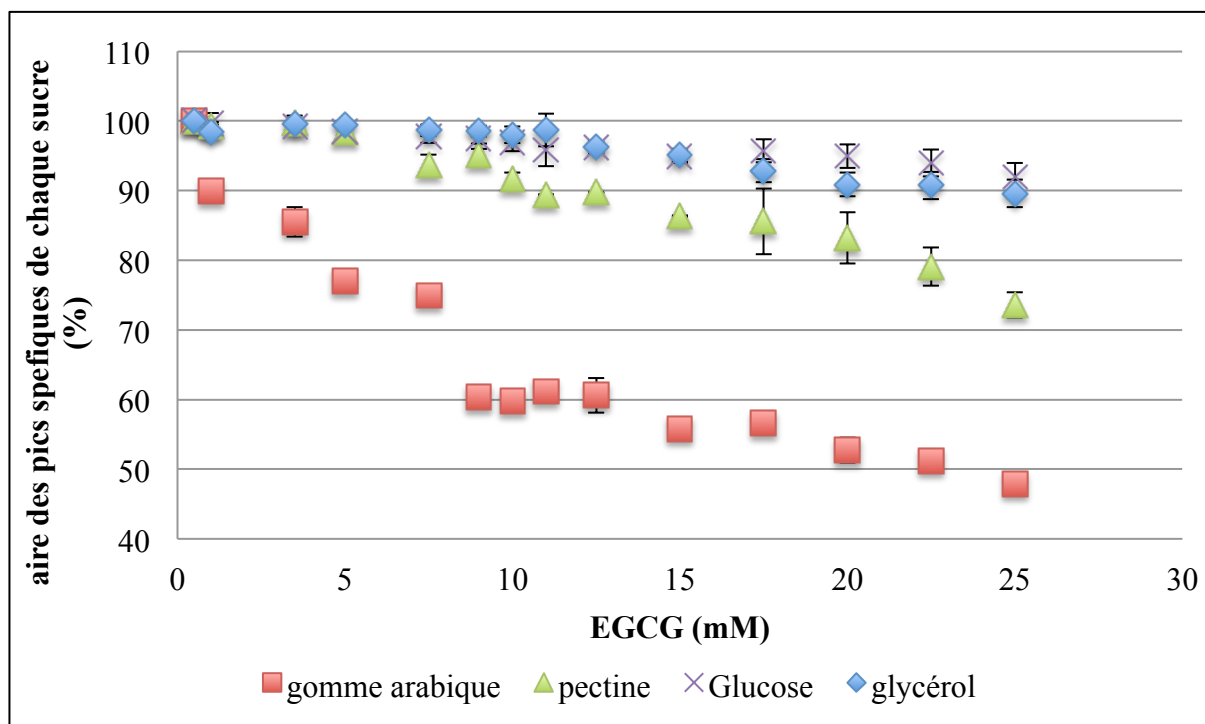


Figure 52 : Baisse observée de la quantité en sucres au cours de la titration en EGCG.

L'observation de cette baisse de la quantité de sucres en solution au cours de l'ajout d'EGCG peut s'expliquer par la formation de complexes entre sucres et tanins. Cette baisse peut être analysée selon un modèle d'interaction du type  $T+S \rightleftharpoons TS$  pour lequel l'intensité du signal que l'on mesure est proportionnel à la concentration en sucres libres.

Pour cela, les courbes de baisse de l'aire des signaux peuvent être paramétrées à l'aide de l'équation suivante modélisant des variations de concentration en ligand libre (Figure 53) (détails en annexes):

$$S_L = -\frac{S_0}{2} \times \left( \left( 1 + \frac{T}{S_0} + \frac{Kd}{S_0} \right) - \left( \left( 1 + \frac{T}{S_0} + \frac{Kd}{S_0} \right)^2 - 4 \times \frac{T}{S_0} \right)^{\frac{1}{2}} \right) + S_0 \quad [\text{IV-D1}]$$

Avec  $S_L$  la quantité de sucre libre en solution (M),  $S_0$  la quantité de sucre initiale (M),  $T$  la concentration en tanins (M),  $Kd$  la constante de dissociation sucres-tanins

Ces paramétrages (Figure 53) ont permis de déterminer les constantes de dissociations entre chaque sucre étudié et l'EGCG. Les résultats sont exposés dans le tableau 9 (page 104).

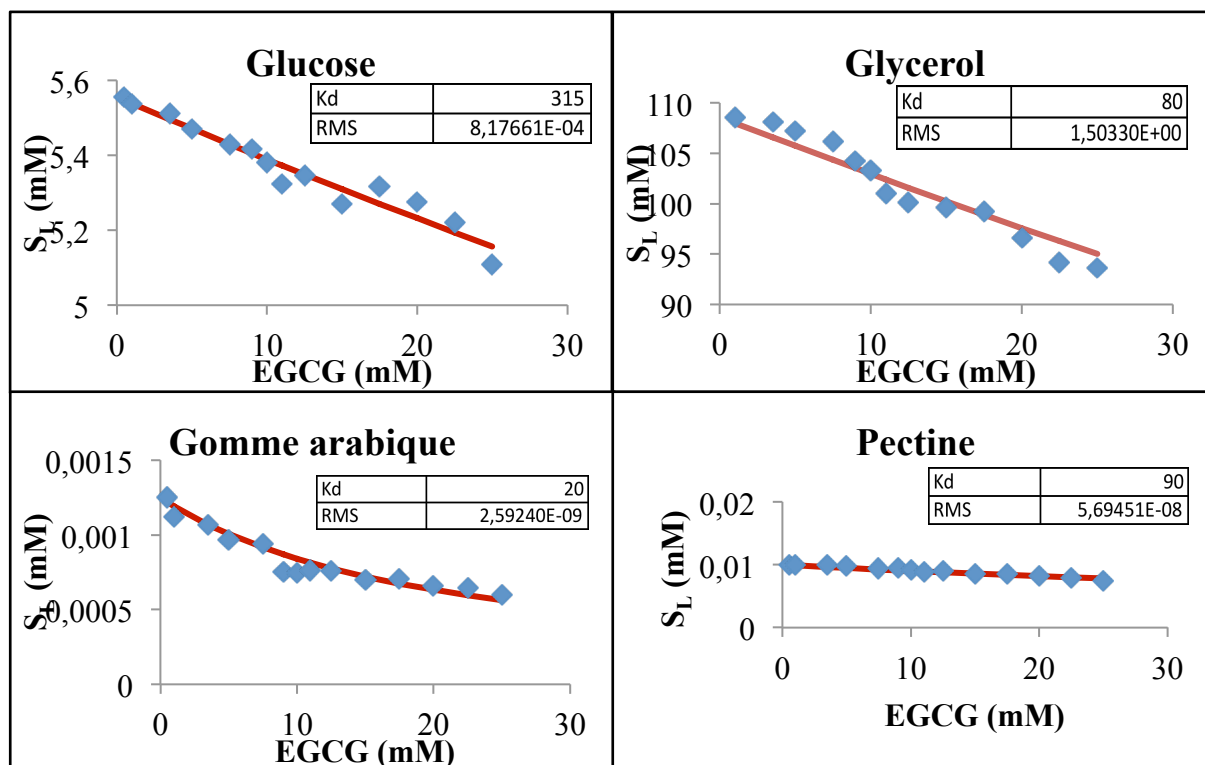


Figure 53 : Baisses de la quantité de chaque sucre lors de la titration en EGCG. Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation IV-D1 permet d'accéder au  $K_d$  (paramètres dans l'encart). La valeur de  $K_d$  est donnée à  $\pm 10\%$ .

Dans le cas du glucose, glycérol et de la pectine les mesures ne présentent pas l'apparition d'une saturation (« plateau » sur les courbes) comme on peut l'observer avec la gomme arabique et ne peuvent pas donner lieu à des calculs précis de  $K_d$ . Néanmoins elles permettent d'affirmer que le  $K_d$  est supérieur aux valeurs trouvées ( $\geq 315$  mM pour le glucose,  $\geq 80$  pour le glycérol et  $\geq 90$  pour la pectine).

## 2. Valeurs des constantes de dissociation obtenues

Les résultats de  $K_d$  ainsi obtenus à partir des analyses quantitatives et de déplacements chimiques des sucres lors de la titration de l'EGCG montrent des résultats similaires. Les résultats sont donnés dans le tableau 9.

L'ensemble de ces données met donc en évidence une interaction entre les sucres et l'EGCG. Cette interaction existe pour l'ensemble des sucres étudiés mais avec des affinités différentes. Les sucres simples comme le glucose présentent de faibles affinités pour le tanin alors que les polysaccharides tels que la pectine et la gomme arabique présentent de plus fortes affinités. Le glycérol quant à lui présente une affinité plus proche de la pectine. Une échelle d'affinité de ces différents sucres vis à vis de l'EGCG a donc pu être établie.

	<b>Kd (mM) obtenus par analyse quantitative (±10%)</b>
<b>Glucose</b>	$\geq 315$
<b>Glycérol</b>	$\geq 80$
<b>Pectine</b>	$\geq 90$
<b>Gomme arabique</b>	20

*Tableau 9 : Valeur des constantes de dissociation Kd entre les différents sucres étudiés et l'EGCG obtenues par analyses quantitatives ou par analyses de déplacements chimiques.*

## E-Titration de la Gomme arabique : analyse des signaux de l'EGCG

La gomme arabique présentant la plus forte affinité pour l'EGCG, ce polysaccharide a été choisi comme modèle pour l'étude d'une titration inverse c'est à dire une titration du sucre dans un tampon contenant une concentration fixe en EGCG. Deux concentrations fixes en EGCG ont été choisies : une en-dessous de la CMC (1 mM) et une au-dessus de la CMC (10 mM), la CMC de l'EGCG étant à environ 6 mM [87].

Pour chaque concentration, un titrage par addition de gomme arabique entre 0 et 2,1  $\mu\text{M}$  a été effectué. Une analyse quantitative des signaux de l'EGCG a cette fois ci été réalisée. L'intégration des signaux des protons 2''6'' (6,85 ppm), 2'6' (6,47 ppm) et des protons 6 (5,98 ppm) et 8 (5,94 ppm) de l'EGCG a été réalisée (Figure 54A). Dans ces deux cas, en-dessous et au-dessus de la CMC, une diminution de la quantité de tanins en solution est observée (Figure 54 B) avec une baisse progressive de l'aire des massifs représentatifs de l'EGCG au cours de l'ajout de gomme arabique.

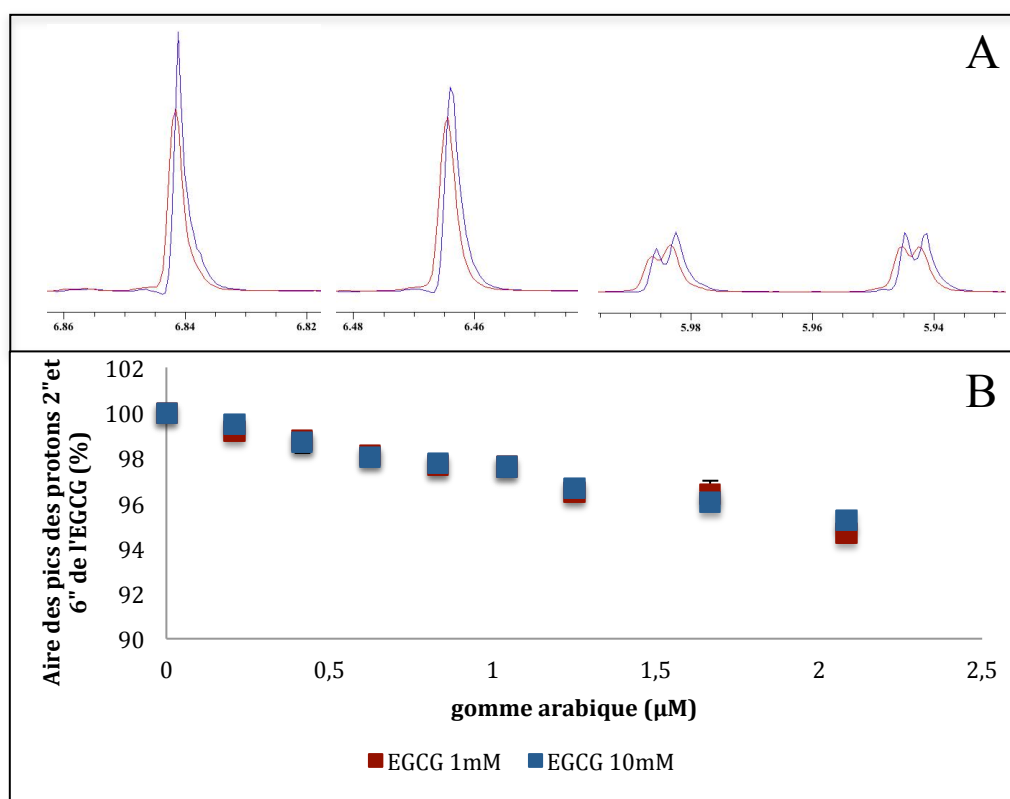


Figure 54 : A: Baisse observée sur le spectre proton 1D de l'aire des massifs spécifiques des protons 6''2'', 6'2' et 6, 8 de l'EGCG a 1 mM (respectivement de gauche à droite) entre 0 et 2,1  $\mu\text{M}$  en gomme arabique (respectivement en bleu et en rouge). B: Baisse observée de l'intensité des signaux des protons 2'' et 6'' de l'EGCG au cours de la titration en gomme arabique.

La diminution de l'intensité des signaux des protons de l'EGCG, observée au cours de cette titration en gomme arabique, confirme également l'existence d'interactions entre EGCG et sucres. La baisse étant, de plus, similaire au-dessus et en-dessous de la CMC de l'EGCG, le sucre peut interagir avec les tanins quel que soit leur état, colloïdal ou non. Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, ces interactions ne modifient pas le comportement colloïdal de l'EGCG, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre.

Cette disparition des signaux à la fois des sucres et des tanins conforte la formation de complexes colloïdaux tanins-sucre suffisamment gros ( $R_H > 15 \text{ nm}$ ) pour ne pas être observables en RMN liquide, mais pas trop ( $R_H < 1 \text{ }\mu\text{m}$ ) puisque la solution ne présente ni précipité, ni trouble.

Ainsi, une étude physique de la formation de ces complexes par DLS a été réalisée afin de pouvoir déterminer la taille des colloïdes formés.

## F- Expériences DLS

Pour confirmer la formation d'un complexe colloïdal entre sucres et tanins, et mesurer leurs tailles, des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS), ont été réalisées sur la gomme arabique en présence d'EGCG. Un échantillon de 2,5  $\mu\text{M}$  de gomme arabique a été solubilisé dans un tampon vin et la taille des particules a été mesurée par DLS. Puis des concentrations croissantes d'EGCG ont été ajoutées à l'échantillon de polysaccharides et la variation de taille des particules de gomme arabique a été mesurée.

Les corrélogrammes (Figure 55) présentent la décroissance de l'intensité diffusée pour chaque échantillon analysé (fonction d'autocorrélation). Plus les courbes se déplacent vers la droite (décroissance plus lente) plus la taille des particules observées augmente.

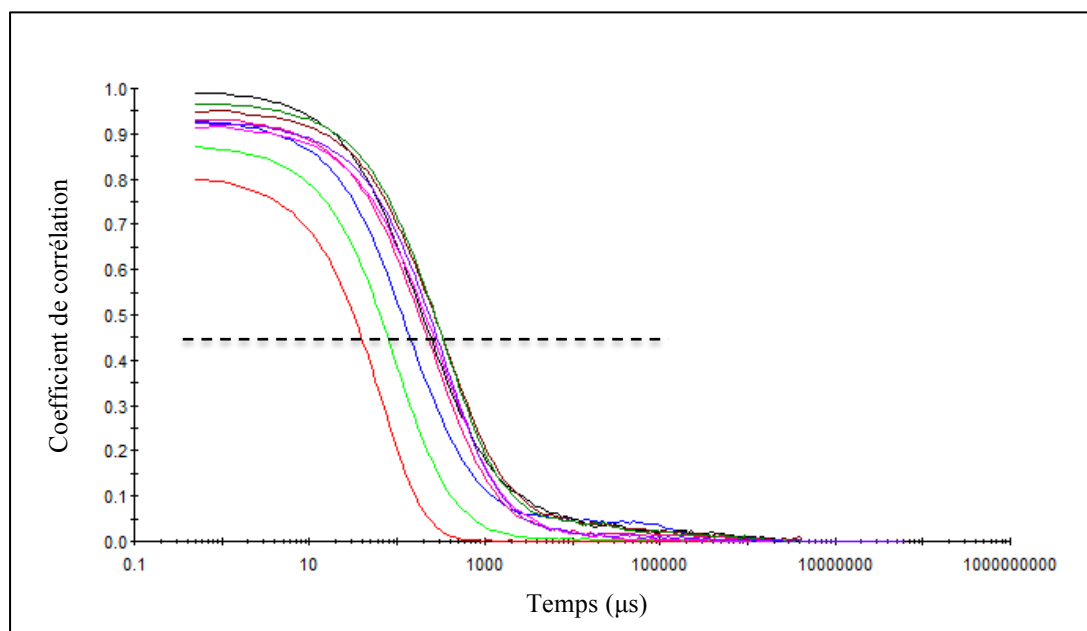


Figure 55 : Corrélogrammes DLS obtenus avec des particules de gomme arabique au cours d'une titration en EGCG entre 0 (rouge) et 10 mM (Violet foncé). La valeur caractéristique de décroissance est mesurée à mi-hauteur au niveau de la droite en pointillée.

La valeur caractéristique de décroissance de cette fonction est mesurée à mi-hauteur (droite pointillée sur le graphe). Ainsi, une décroissance rapide du signal produit par la gomme arabique, est visible en absence d'EGCG avec une valeur caractéristique de 48  $\mu\text{s}$ , traduisant un déplacement rapide des particules de gomme arabique. En revanche, au fur et à mesure de l'ajout d'EGCG, cette décroissance ralentit jusqu'à une valeur caractéristique de 258  $\mu\text{s}$  traduisant un déplacement plus lent des particules. Cet effet met en évidence une croissance des particules : les tanins interagissent avec la gomme arabique formant des particules plus grosses qui diffusent donc plus lentement.

Les distributions en nombres (Figure 56 A) mettent également en évidence une augmentation de la taille des particules de 10 à 19.5 nm. La représentation de cette augmentation de taille en fonction de la concentration en EGCG (Figure 56 B) montre deux étapes : une première étape avec une augmentation de la taille des particules jusqu'à 6 mM d'EGCG et la seconde avec une stabilisation de la taille au dessus de cette concentration en tanins. D'autre part, la dispersion en tailles déterminée à mi-hauteur pour chaque distribution évolue dans le sens inverse, avec une baisse au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en EGCG.

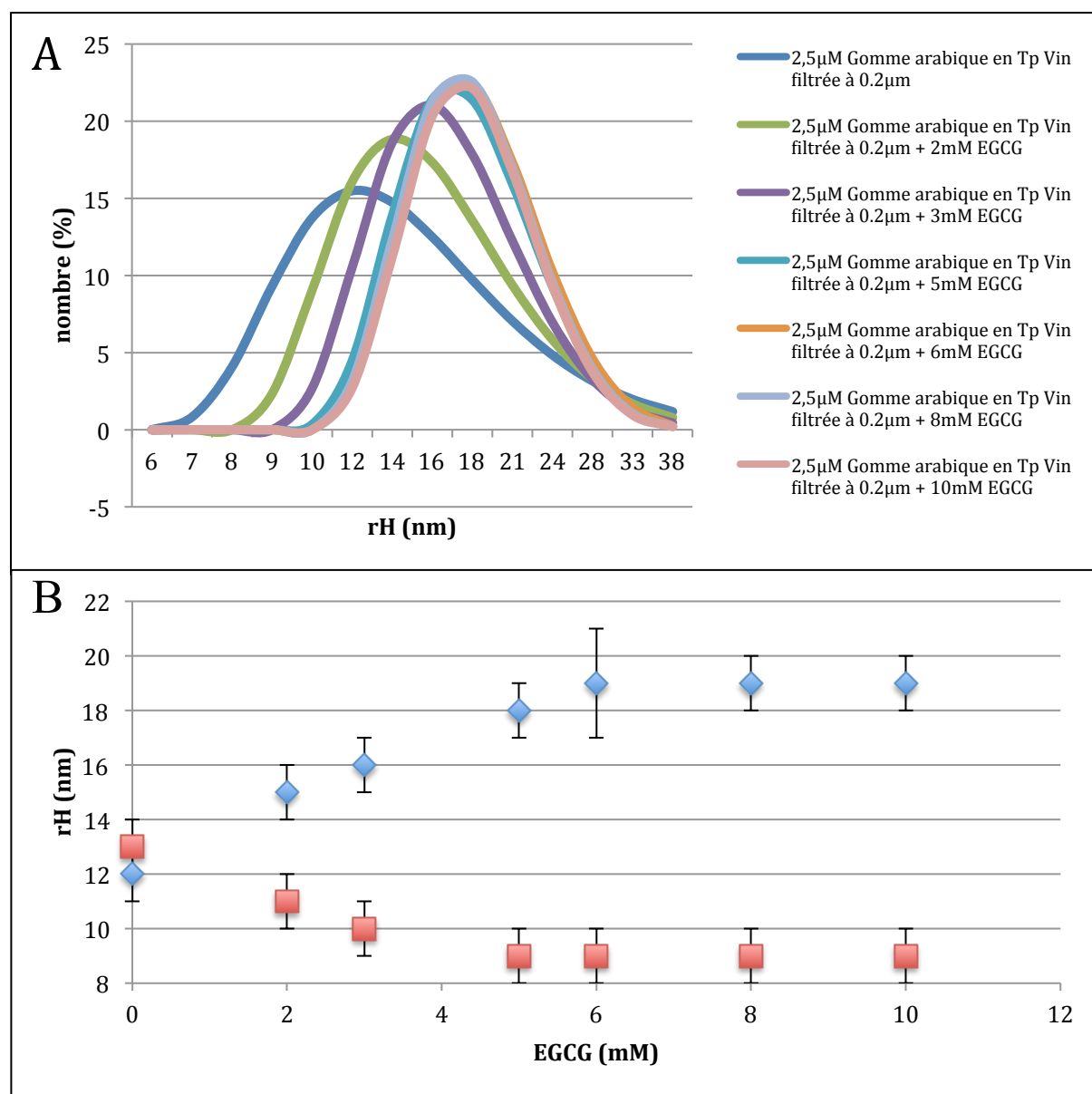


Figure 56 : A : Représentation en nombre de la taille des particules de gomme arabique au cours de la titration en EGCG entre 0 et 10mM. B : Evolution de la taille des particules en fonction de la concentration en EGCG (Bleu) et évolution de la dispersion en tailles (Rouge)



Ces observations mettent donc en évidence une fixation des molécules d'EGCG sur la gomme arabique. Cette interaction a pour conséquence une augmentation de la taille des particules du simple au double accompagnée d'une diminution de la dispersion en tailles.

Ces expériences de DLS confirment donc la formation de colloïdes tanins-sucre d'une taille suffisamment importante ( $R_H > 15$  nm) pour que le signal disparaisse en RMN des liquides. En effet cette taille de particule correspond à la gamme de taille à partir de laquelle Mouret *et al.* ont observé une disparition de signal en RMN liquide lié à l'apparition d'interaction solide de type couplage dipolaire [179].

## G- Discussion sur l'effet des sucres testés

Plusieurs études d'interactions entre sucres et tanins ont déjà été réalisées par différentes équipes, principalement en étudiant des extraits de polysaccharides complexes issus du vin tels que les RG-II ou AGP et des extraits de procyanidines avec différents degrés de polymérisation. [142, 180] Ces études ont toutes mis en évidence une influence des polysaccharides sur le comportement colloïdal des procyanidines, dépendant du type de sucres étudiés et du degré de polymérisation des procyanidines. Ces deux études présentant des conclusions divergentes en fonction des polysaccharides étudiés, il nous a semblé important d'étudier le comportement colloïdal d'un polyphénol modèle l'EGCG en présence de sucres « modèles » moins complexes.

Ainsi, dans ce chapitre, il a été démontré que l'EGCG et certains sucres, simples comme le glucose et le glycérol ou polysaccharides comme la pectine ou la gomme arabique, pouvaient former des particules colloïdales avec des tailles de l'ordre d'une vingtaine de nm. La taille de ces complexes, qui a été déterminée par DLS dans le cas de la gomme arabique, est suffisamment importante pour induire la disparition du signal RMN dans des conditions d'acquisitions de type RMN liquide. En effet, la formation de complexe de taille supérieure à 15 nm de rayon hydrodynamique provoque un mouvement plus lent des particules et se traduit par un élargissement des raies sur les spectres proton en RMN du liquide.

Ce phénomène est connu, la disparition du signal étant liée à la présence d'interactions de type solide (couplages dipolaires) identiques à celles mises en évidence par Mouret et al en 2014 [179]. Cette équipe a montré que les spectres proton des phospholipides de SUVs seules, présentent des signaux fins et précis liés aux mouvements rapides des vésicules ainsi que des phospholipides au sein de la bicouche. En revanche, lorsque du cholestérol est ajouté à cette bicouche, cela provoque un élargissement des raies lié à une diminution de la mobilité lipidique provoquant l'apparition de couplages dipolaires. En effet, dans une solution isotrope et dans le cas d'un échange rapide, ces couplages sont moyennés à zéro en raison de la diffusion rotationnelle, mais dans le cas d'une dynamique plus lente, on se retrouve dans le régime des mouvements intermédiaires qui conduit à un échange plus lent entre les molécules dans les divers états (libre et associé) provoquant un élargissement des raies.

Cet effet a pu être annulé en enregistrant des spectres RMN en rotation à l'angle Magique (HRMAS) confirmant ainsi la formation de ces complexes colloïdaux. La disparition du signal observée en RMN des liquides reflète donc la proportion de complexes EGCG-sucre formés tout au long des titrations.

Le suivi de cette disparition a donc permis de mesurer les constantes de dissociation  $K_d$  des différents complexes EGCG-sucre formés. Les valeurs obtenues varient d'un sucre à un autre et montrent que la gomme arabique présente plus d'affinité que les autres sucres testés pour l'EGCG. Cette observation semble en accord avec celle de Soares et al en 2012, qui en étudiant l'effet de la gomme arabique sur les interactions entre PRPs et tanins condensés ont mis en évidence une dissociation par compétition due à la fixation des tanins sur la gomme arabique [146]

De plus, les analyses de ces interactions ayant été réalisées à des concentrations supérieures et inférieures à la CMC de l'EGCG et présentant le même effet, l'interaction de la gomme arabique avec ce polyphénol a lieu indépendamment de son état colloïdal.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence un nouveau schéma d'interaction entre tanins en présence de sucres mettant en évidence une interaction entre les sucres étudiés et l'EGCG mais ne modifiant pas les propriétés d'auto-association des tanins en solution dans les conditions utilisées (Figure 57)

Le  $K_d$  entre glucose et EGCG est de l'ordre de 315 mM contre 21 mM pour l'auto-association de l'EGCG. Ces deux valeurs traduisent la présence d'une faible interaction entre EGCG et Glucose. En revanche, en présence de gomme arabique, les valeurs de  $K_d$  sont très proches, 20 mM contre 21 mM, et mettent en évidence un phénomène possible de compétition. D'autre part, les mesures étant réalisées uniquement en RMN des liquides, elles ne correspondent qu'à des mesures de l'EGCG libre en solution, la partie colloïdale formée ne pouvant être observée (couplage dipolaire). De cette manière, la perte maximale d'EGCG observé en présence de sucres n'étant que de 8% (dans les conditions de concentration dans les vins de Bordeaux), l'interaction de la gomme arabique a lieu préférentiellement avec les tanins libres en solution, ce qui n'influence que peu, voire pas du tout l'équilibre. Ce phénomène expliquerait ainsi l'absence d'effet des sucres sur le comportement colloïdal de l'EGCG avec des valeurs de CMC et d'auto-association observées identiques à celles mesurées en absence de sucres [92].

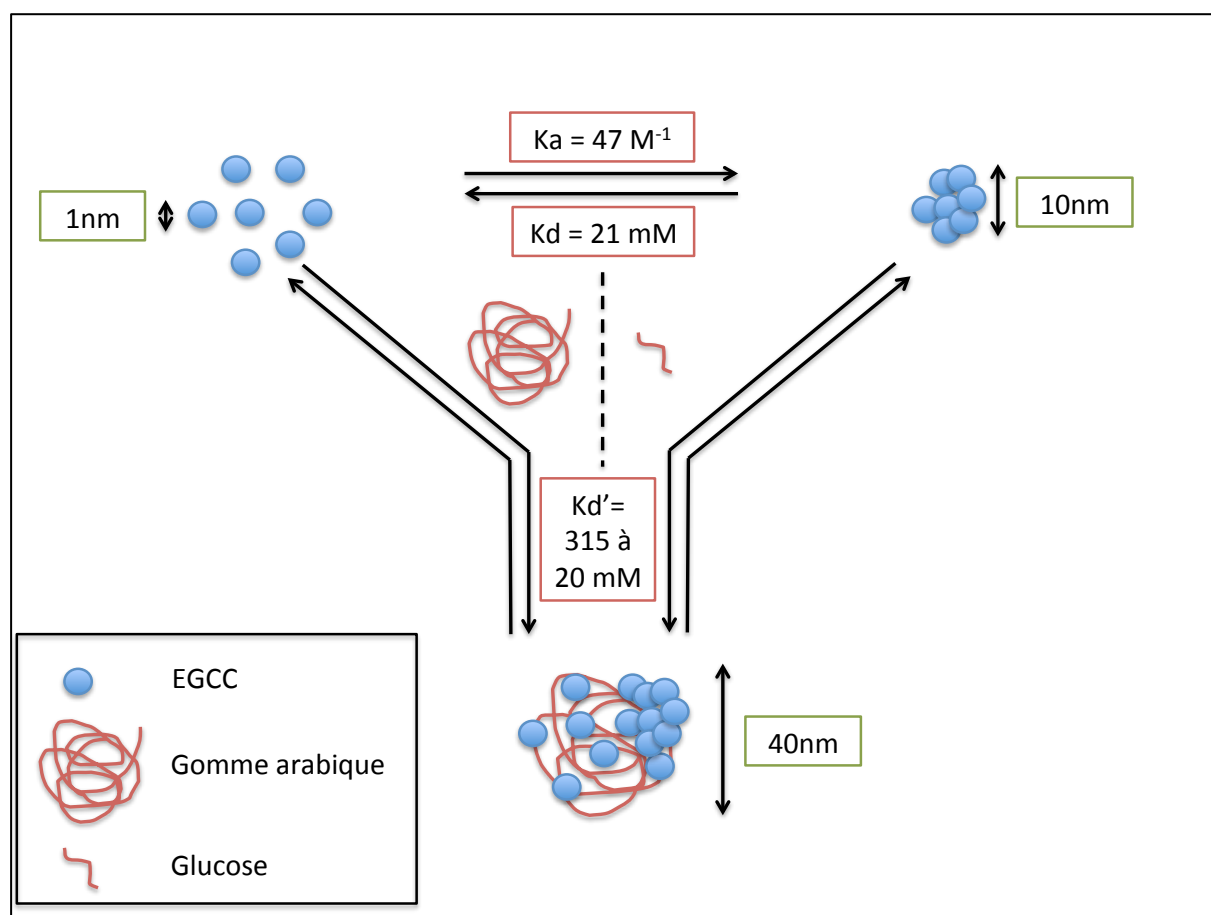


Figure 57 : Nouveau schéma d'auto-association de l'EGCG en présence de sucres. La gomme arabique ou le glucose peuvent interagir avec les molécules d'EGCG au-dessus et au-dessous de la CMC avec des  $K_d$  respectif de 20 et 315 mM. Cette interaction a lieu préférentiellement avec les tanins libres en solution et n'influence que peu voire pas du tout l'auto-association de l'EGCG.

D'autre part, il est à noter que la gomme arabique est un polysaccharide composé d'environ 1300 unités monosaccharides représentant ainsi une chaîne 1300 fois plus longue que le glucose, mais que sa concentration efficace pour provoquer une interaction avec l'EGCG est 1000 fois plus faible (quelques  $\mu\text{M}$ ) que celle des monosaccharides comme le glucose (quelque mM).

De la même manière pour la pectine, celle-ci possède une chaîne d'environ 550 unités monosaccharides avec une concentration efficace d'environ 10  $\mu\text{M}$ .

Ainsi une première importance de la longueur de la chaîne polysaccharidique des sucres dans l'interaction avec les procyanidines a pu être mise en évidence et une échelle d'affinité avec l'EGCG et de gamme de concentration efficace a pu être réalisée (Figure 58).

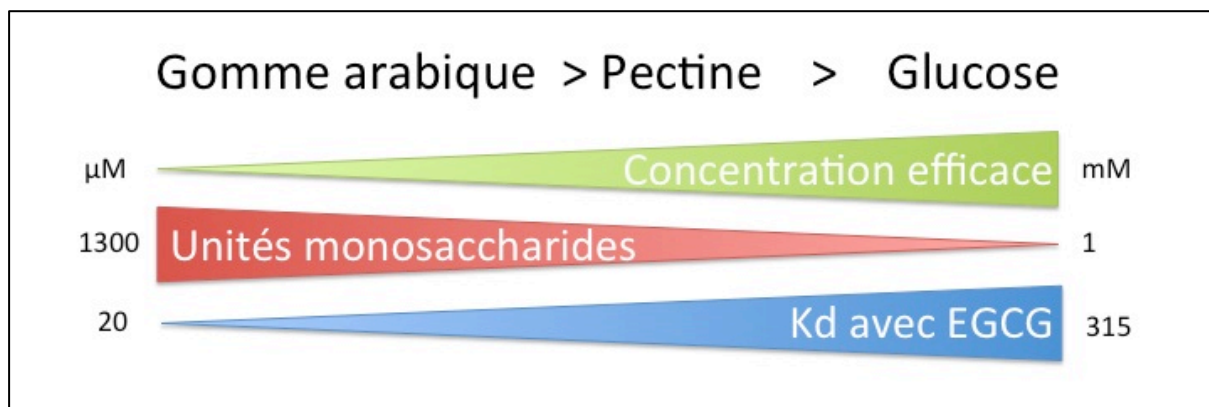


Figure 58 : Echelle d'interaction des différents polysaccharides avec l'EGCG. En vert est représenté la concentration en sucre efficace pour observer une interaction, en rouge la longueur de la chaîne polysaccharidique, et en bleu l'évolution de la constante de dissociation entre sucres et EGCG.

Pour conclure, à travers ce chapitre nous avons donc proposé un nouveau schéma d'auto-association d'une procyanidine modèle, l'EGCG, en présence de différents sucres simples (glucose) ou polysaccharides (gomme arabique et pectine). Une interaction entre sucres et EGCG a été mise en évidence et une échelle d'affinité a pu être proposée mais ne modifiant pas l'auto-association de l'EGCG dans les conditions utilisées.

**CHAPITRE V :**  
**EFFET DES SUCRES SUR LES**  
**INTERACTIONS TANINS-PROTEINES**

La sensation d'astringence, comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, est le résultat de l'interaction entre les tanins du vin et les protéines de la salive.

Ainsi, après avoir étudié dans un premier temps l'impact des sucres sur le comportement colloïdal des tanins, nous allons à présent nous intéresser à l'impact de ces mêmes sucres sur les interactions entre protéines salivaires et tanins.

Pour cela une étude a été réalisée en deux temps avec tout d'abord un peptide salivaire, modèle représentatif de la famille des Protéines Riches en Proline PRPs, IB9-14, et dans un second temps une PRPs complète IB9-61 possédant le fragment IB9-14 au sein de sa séquence. La protéine IB9-61 possédant trois répétitions de la séquence du peptide IB9-14, cette étude en deux étapes permet, en plus d'étudier l'impact des sucres sur les interactions tanins-protéines, d'étudier l'impact de la longueur de la chaîne peptidique dans ces interactions. Une première étude préliminaire avec le peptide IB9-14 et un peptide de 37 acides aminés (IB9-37) a déjà été réalisée en 2012 par Cala *et al* [65].

Dans ce chapitre, le tanin modèle utilisé pour étudier ces interactions reste l'EGCG permettant un comparatif direct à la fois entre les deux peptides et entre l'impact des sucres sur le comportement colloïdal des tanins et les interactions entre tanins et protéines salivaires.

Pour cette étude, la RMN des liquides a été utilisée afin de caractériser les interactions qui ont lieu entre les deux peptides riches en prolines et l'EGCG en présence de différents sucres dans le milieu (5,6 mM de glucose, ou 0,1 mM de glycérol, ou 1,3  $\mu$ M de gomme arabique ou encore 10  $\mu$ M de pectine).

Les différentes expériences RMN que nous avons utilisées ont permis d'obtenir des informations, d'une part sur les structures primaires et tridimensionnelles mais également sur les affinités des interactions et la taille des complexes formés.

## A- Partie expérimentale

### 1. Matériels

L'EGCG, le glucose, le glycérol, la gomme arabique et la pectine utilisés dans ces études proviennent de Sigma Aldrich. Les solvants deutérés D<sub>2</sub>O et Ethanol-D<sub>6</sub> proviennent de chez Euriso-top. Les peptides salivaires IB9-14 et IB9-61 ont été produits par synthèse chimique au laboratoire (selon le protocole décrit dans le chapitre II).

### 2. Préparation des échantillons

#### a. Solution tampon utilisée

Les différents échantillons ont été dissous dans un tampon mimant le vin identique à celui utilisé dans le chapitre précédent (cf. chapitre IV-A 2.a.)

#### b. Préparation des échantillons

##### i. Titration de l'EGCG

##### Cas du peptide IB9-14

La titration de l'EGCG a été réalisée sur une gamme de 14 échantillons de tanins dans des concentrations allant de 0,5 à 25 mM (0,5 ; 1 ; 3,5 ; 5 ; 7,5 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12,5 ; 15 ; 17,5 ; 20 ; 22,5 ; 25) en présence de 0,5 mM en peptide IB9-14 et en absence de sucre (servant de contrôle), ou en présence de sucre avec 5,6 mM de glucose, ou 0,1 mM de glycérol, ou 1,3 µM de gomme arabique ou encore 10 µM de pectine. Ces concentrations de sucre ont été choisies par rapport aux concentrations qui sont couramment trouvées dans les vins (cf. chapitre I-E).

##### Cas du peptide IB9-61

Dans le cas du peptide IB9-61, une série de titrations de deux polyphénols monomères et dimères (EGCG et B3) en absence de sucres ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le peptide IB9-14.



## ii. Titration de la Gomme arabique

La titration de la gomme arabique a été réalisée uniquement sur le peptide IB9-14 sur une gamme de 10 échantillons allant de 0 à 2,5  $\mu\text{M}$  (0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 1,3, 1,7; 2,1 ; 2,5) en présence de 1 mM ou 10 mM d'EGCG et de 0,5 mM d'IB9-14 dans chaque cas.

## 3. Enregistrement des spectres RMN

Les spectres ont été enregistrés à 298K sur un spectromètre Bruker AVII standard bore 700 MHz équipé d'une sonde TXI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$  de 5 mm, comprenant un canal pour le lock du deutérium  $^2\text{H}$  et équipée d'un système ATMA.

L'ensemble des déplacements chimiques des protons a été donné en respectant comme référence interne l'éthanol deutéré présent dans le milieu Vin employé. Cette référence a également servi pour la normalisation des données quantitatives.

Quatre types de séquences RMN 1D et 2D distinctes ont été utilisées lors de cette étude. Dans un premier temps, des expériences proton 1D watergate, ainsi que des expériences TOCSY 2D [156] ont été enregistrées afin d'observer les déplacements chimiques des protons des peptides et permettre l'attribution des résonances. Dans un deuxième temps, le suivi des interactions a été effectué en utilisant, principalement, deux techniques physicochimiques complémentaires, des expériences RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) afin de mesurer les coefficients de diffusion transversale  $D$  et des expériences STD (Saturation Transfert Diffusion) afin de déterminer les sites d'interaction.

### a. Spectres proton 1D

Les spectres protons 1D ont été enregistrés en utilisant une séquence watergate pour la suppression du signal de l'eau. Les paramètres utilisés pour ces expériences étaient les suivants : une fenêtre spectrale de 12 ppm, une impulsion à  $90^\circ$  de 7  $\mu\text{s}$ , une impulsion pour le watergate de 9  $\mu\text{s}$  ; un temps de recyclage de 5 s incluant 3 s de temps d'acquisition et 2 s de délai de relaxation pour être sûr d'avoir une relaxation totale du signal.

### b. Spectres proton 2D

Les expériences TOCSY 2D, NOESY et ROESY ont été enregistrées en utilisant le mode States-TPPI, une fenêtre spectrale de 7692 Hz dans les deux dimensions, un domaine de temps de 2048 points et un incrément de 256 en  $t_1$ . Le temps de relaxation est fixé à 2 s, et 16 scans ont été enregistrés par incrément en  $t_1$ . Un spinlock de 100 ms a été utilisé.

### c. Spectres Dosy

Les mesures de diffusion DOSY ont été enregistrées de la même manière que dans le chapitre précédent (cf. chapitre IV-A 3.b.) avec pour paramètre : une fenêtre spectrale de 12 ppm ; un nombre de scans de 128 ; un temps de recyclage de 2 s ; un délai intergradients  $\Delta$  de 200 ms ; une durée de gradient  $\delta$ , de 3 ms. La puissance des gradients a été paramétrée de façon à obtenir une variation linéaire de 2 à 95% du maximum de leur puissance en 16 étapes.

Le coefficient de diffusion  $D$ , calculé de la même manière que dans le chapitre précédent est utilisé pour déterminer la constante de dissociation  $K_d$  entre nos peptides et l'EGCG

### d. Spectres STD

Les expériences de STD en RMN du proton ont été enregistrées à l'aide d'une séquence avec des saturations sélectives de la protéine « on-résonance » appliquées à 1 ppm et « off-résonance » appliquées à 35 ppm. Cette séquence RMN consiste en une séquence 1D proton à laquelle est ajoutée une cascade d'impulsions pour la saturation alternant entre les phases « on-résonance » et « off- résonance » et couplée à une séquence « spoil » permettant d'éviter les effets de magnétisation non désirés [172]. Ainsi, les spectres RMN STD ont été acquis à 298K en utilisant pour la saturation une cascade de 40 impulsions gaussiennes espacées de 50 ms ; avec un délai entre chaque impulsion de 100  $\mu$ s ce qui correspond à un temps total de saturation de 2 s. Une séquence watergate [177] a été utilisée pour la suppression du signal résiduel de l'eau. Un filtre « spinlock » de 5 kHz et de 10 ms a été appliqué pour supprimer le signal résiduel de la protéine.

Le spectre de différence « on résonance » et « off résonance » permettra ainsi de n'observer que les protons du tanin impliqués dans l'interaction avec la protéine. [172]

Le traitement de l'ensemble des données et leur analyse ont été réalisés en utilisant le programme Topspin version 2.1 de la société Bruker.

## B-Etude du peptide IB9-14

La structure du peptide IB9-14 synthétisé au laboratoire à été contrôlée en utilisant la stratégie proposée par Wuthrich [153]. Le peptide IB9-14 ayant déjà été étudié au laboratoire, sa structure 3D n'a pas été recalculée, mais les deux premières étapes de la stratégie d'attribution de Wüthrich ont été réalisées afin de vérifier son attribution complète.

### 1. Attribution des résonances du peptide

#### a. Attribution des résonances protons

Dans un premier temps, toutes les résonances des protons de chaque acide aminé du peptide ont été attribuées à partir d'un jeu d'expériences RMN proton 1D et 2D de type TOCSY. Ces deux séquences nous ont permis d'obtenir la valeur des déplacements chimiques de chaque proton de chaque résidu.

Deux régions spectrales sont importantes pour l'étude structurale de ce peptide.

Tout d'abord la région montrant les corrélations entre les NH et les protons de la chaîne latérale ( $H\alpha$ ,  $H\beta$ ,  $H\gamma$ ,  $H\delta$ ,  $H\epsilon$ , NH secondaires, ...) située entre 8,6 et 7,8 ppm dans la dimension fréquentielle F2 et 8 et 0 ppm dans la dimension fréquentielle F1. Cette zone permettant d'attribuer tous les protons des acides aminés (Figure 59A).

D'autre part, la région montrant les corrélations entre les protons  $H\alpha$  des prolines et les protons  $H\beta$  et  $H\gamma$  du cycle pyrrolidine entre 3 et 1 ppm en F2 et 3 et 6 ppm en F1.

Ainsi, pour l'analyse des prolines, deux régions se distinguent en fonction des résidus l'avoisinant. Lorsqu'une proline est suivie d'une autre proline, le proton  $H\alpha$  résonne à plus haut champ autour de 4.5 ppm, c'est le cas des prolines P3, P6, et P11 ; alors que si cette proline a pour voisin un quelconque autre résidu, ce même proton résonne à plus bas champ autour de 5.0 ppm, comme pour les proline P2, P10, et P9 (Figure 59 B).

Cette expérience nous a donc permis de retrouver les 2 Glutamines, les 4 Glycines, la Lysine, et les 6 Prolines de la séquence IB9-14, seule la serine de bout de chaîne n'étant pas visible à cause de l'échange du groupe amine-terminal avec les protons de l'eau.

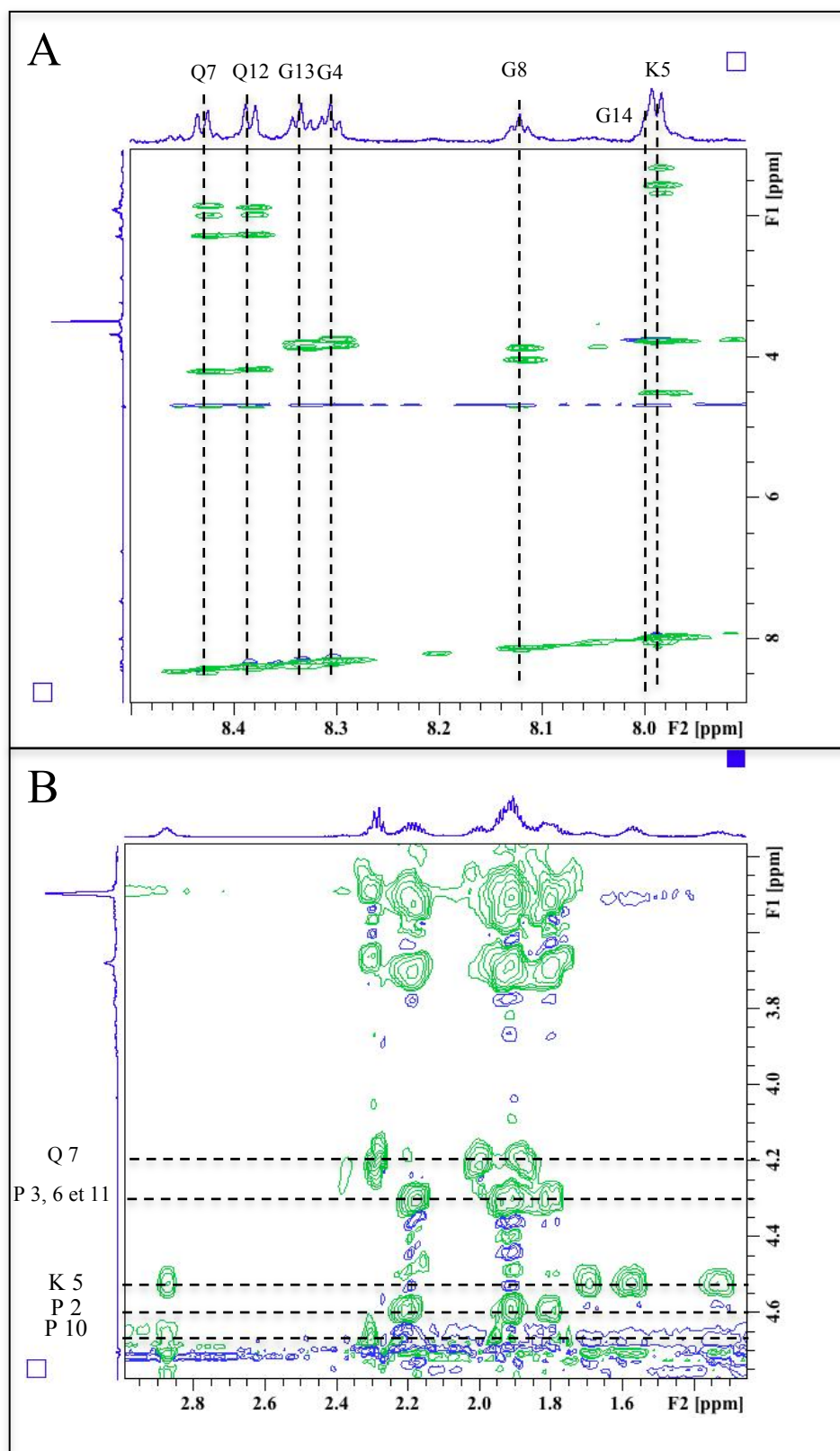


Figure 59 : Carte partielle de spectres RMN 2D-TOCSY d'IB9-14. Enregistrée à 700 MHz, 298 K, pH 3.5, avec le peptide à une concentration de 1 mM en tampon Vin  $H_2O:D_2O:EtOD$  (80/8/12, v/v/v). L'attribution des résonances des protons du peptide dans la région des NH (A) et la région des protons Ha des prolines (B) sont présentées sur la projection 1D ou sur la carte 2D.

### b. Attribution séquentielle du peptide

Dans un second temps, après avoir attribué l'ensemble des systèmes de spins de chaque acide aminé, il a fallu attribuer leur position dans la chaîne peptidique.

Pour cela une expérience 2D-ROESY (Rotating-frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permettant de corrélérer deux spins distants de moins de 5 Å, a été utilisée. Ainsi, des effets NOE apparaissent entre le proton H $\alpha$  d'un résidu (i) et le proton NH amide du résidu (i+1) (Figure 60). Cette technique proposée par Wutrich, il y a plus de 20 ans [153] permet ainsi l'attribution séquentielle d'un peptide.

Mais dans tous les cas, un problème persistant reste la proline, qui dès lors qu'elle est présente apporte une rupture dans l'attribution séquentielle d'une chaîne peptidique. Ainsi, dans le cas du peptide IB9-14, les ruptures dans l'attribution séquentielle liées à la présence des prolines sont nombreuses. Cependant une solution alternative existe consistant à compléter l'attribution séquentielle par les corrélations entre le proton H $\alpha$  du résidu (i) et le proton H $\delta$  du résidu proline (i+1) [104, 125] (cf. chapitre II).

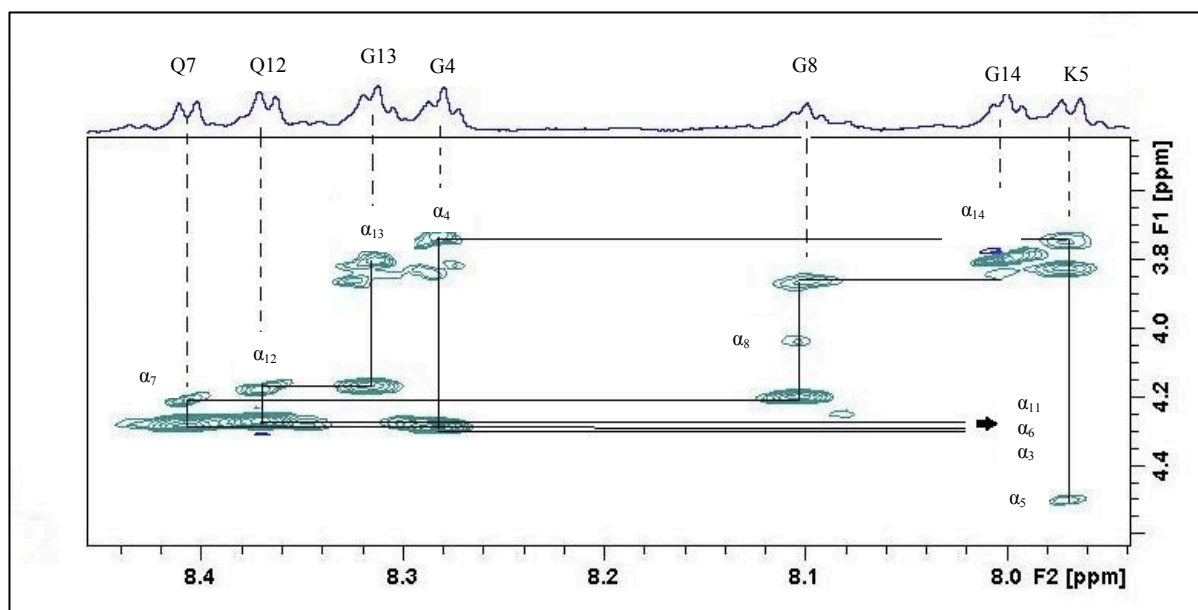


Figure 60 : Carte 2D-ROESY de la région des NH amides en dimension F2 et des H $\alpha$  en dimension F1 obtenue à 700MHz, à 298K, pH 3,5 avec 1 mM d'IB9-14 en tampon Vin H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/EtOD (80/8/12, v/v/v). L'attribution des acides aminés est indiquée en pointillé et les corrélations entre le proton H $\alpha$  du résidu (i) et le proton NH du résidu (i+1) sont présentées en trait plein.

L'interprétation de l'ensemble de ces spectres a ainsi permis d'attribuer l'ensemble des résonances du peptide IB9-14 (tableau 10) :

	N-H	Ha	Hb1	Hb2	Hg	Hd	He
<b>Sérine 1</b>		4,29	3,73	3,54			
<b>Proline 2</b>		4,65	2,31	1,75	1,96		
<b>Proline 3</b>		4,29	2,18	1,78	1,91		
<b>Glycine 4</b>	8,31	3,82					
<b>Lysine 5</b>	8,00	4,53	1,69		1,33	1,57	3,83
<b>Proline 6</b>		4,29	2,18	1,78	1,91		
<b>Glutamine 7</b>	8,45	4,21	1,99	1,85	2,29		
<b>Glycine 8</b>	8,14	4,05					
<b>Proline 9</b>		4,57	2,20	1,80	1,91		
<b>Proline 10</b>		4,75	2,30	1,95	1,77		
<b>Proline 11</b>		4,29	2,18	1,78	1,91		
<b>Glutamine 12</b>	8,40	4,18	1,99	1,86	2,26		
<b>Glycine 13</b>	8,34	3,83					
<b>Glycine 14</b>	8,06	3,82					

Tableau 10 : Déplacements chimiques des protons en ppm du peptide IB9-14 obtenus à 700 MHz, à 298K, pH 3,5 avec 1 mM d'IB9-14 en tampon Vin H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/EtOD (80/8/12, v/v/v). La précision est de 0,01 ppm.

## 2. Effet des sucres sur l'interaction tanins-protéines

### a. Mise en évidence des sites de fixation

Une fois l'attribution du peptide réalisée et son bon enchainement vérifié, une première étape d'étude a été de déterminer les sites de fixation de l'EGCG sur le peptide IB9-14 en présence des différents sucres.

De la même manière que pour l'auto-association de l'EGCG (cf. chapitre IV-B), le processus d'interaction entre ce tanin et le peptide IB9-14 a pu être étudié en suivant les variations de déplacements chimiques des résonances du peptide en fonction de la concentration en tanin.

La variation de déplacement chimique maximale de chaque proton des acides aminés du peptide peut ainsi être mesurée, lors d'une titration en EGCG entre 0 et 6 mM, le tout en absence ou en présence de sucre dans le milieu (Figure 61). Le choix de cette gamme de concentration en EGCG consiste à rester dans un état d'interaction spécifique en solution, sans atteindre un état de précipitation au delà duquel des interactions non spécifiques entreraient en jeu [65].

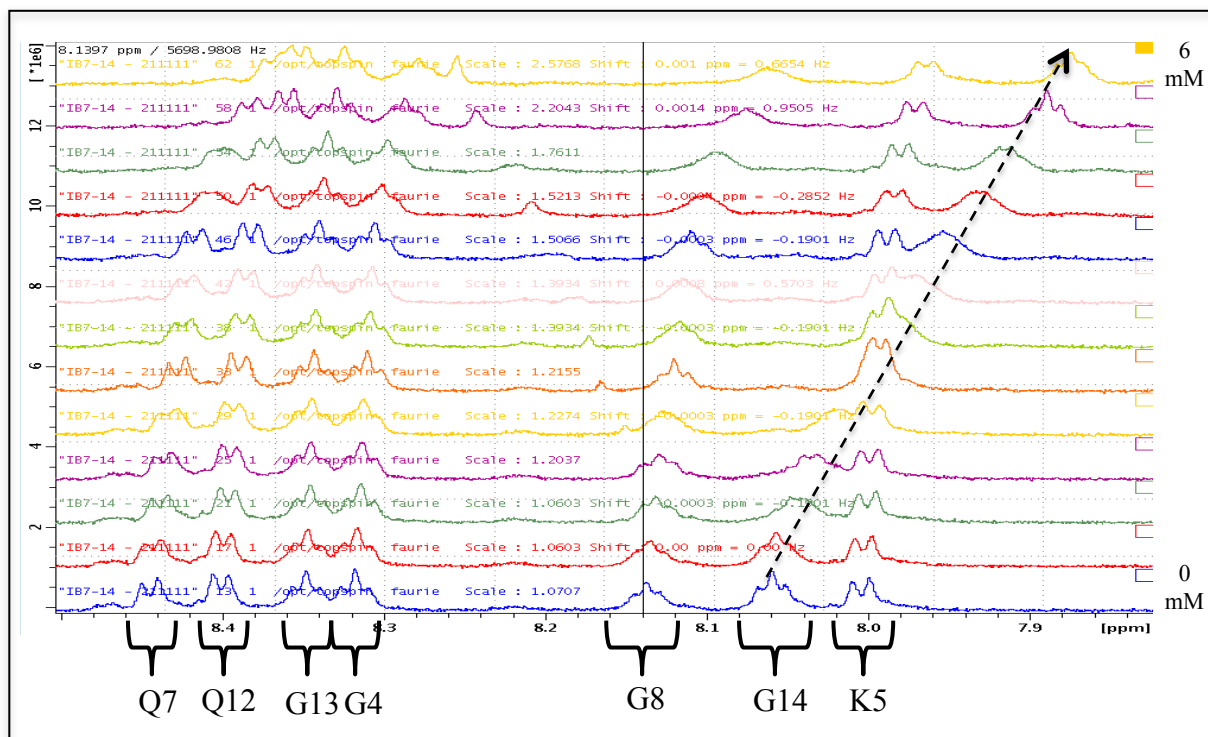


Figure 61 : Déplacements des protons NH du peptide IB9-14 lors de l'ajout croissant d'EGCG entre 0 et 6 mM.

Comme le présente la figure 62, l'augmentation de la concentration en EGCG n'affecte pas de la même manière tous les déplacements chimiques des acides aminés du peptide. En revanche, que se soit en absence ou en présence de sucres et quelque soit le type de sucres, les variations maximales de déplacements chimiques ont toujours lieu pour les mêmes cinq acides aminés que sont la proline 2, la proline 9, la proline 10, la glycine 13 et la glycine 14 (Figure 62).

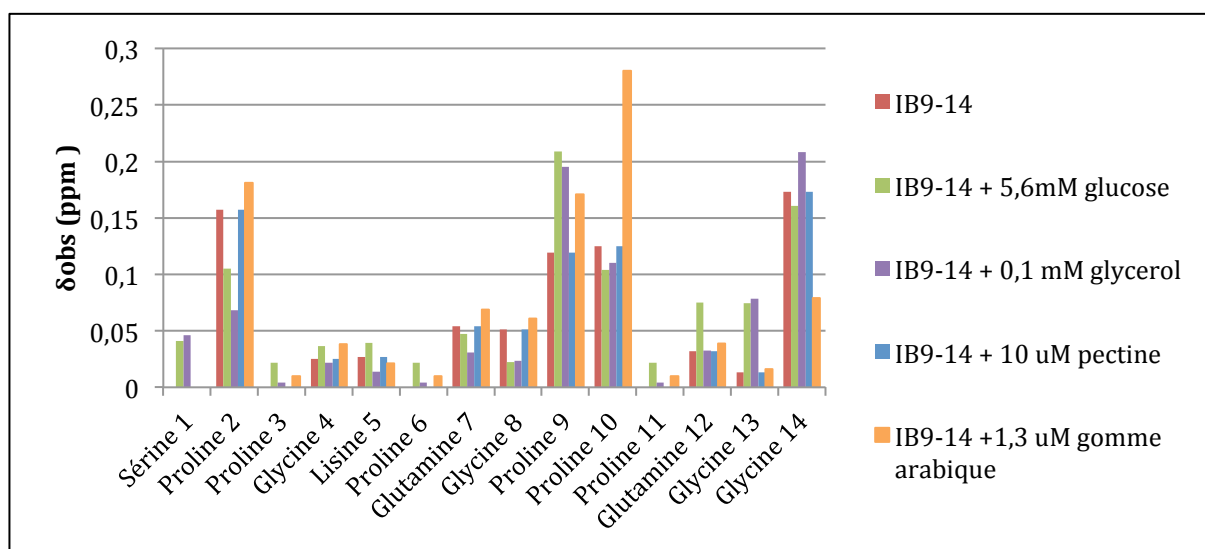


Figure 62 : Variation des déplacements chimiques des NH des résidus d'IB9-14 (Ha pour la sérine 1 et les prolines 2, 3, 6, 9, 10 et 11) suite à l'ajout de 6 mM d'EGCG. Les crochets rouges représentent les acides aminés dont les déplacements varient le plus lors de l'ajout d'EGCG.

La présence de sucre dans le milieu ne modifie donc pas les sites d'interactions entre l'EGCG et le peptide IB9-14 sauf peut être en bout de chaîne où une légère diminution de la variation maximale du déplacement chimique des glycines 13 et 14 est visible en présence des polysaccharides (gomme arabique et pectine).

### b. Mesure des constantes de dissociation

De la même manière que pour l'étude du comportement colloïdal de l'EGCG, l'analyse des déplacements chimiques du peptide peut également permettre de remonter à la constante de dissociation du complexe tanins-protéines salivaires. En effet, l'évolution de ces déplacements chimiques en présence ou absence de sucres observe le même profil de courbes, avec un effet de saturation, en accord avec une fixation spécifique.



Ces courbes peuvent être lissées en utilisant un modèle de fixation simple dans lequel  $n$  tanins peuvent se fixer au peptide avec la même constante de dissociation  $K_d$  selon l'équation [III-C1<sub>3</sub>] rappelée ci-dessous (cf. chapitre III-C 1 b.i.) [104, 107] :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{\max} \left( 1 + \frac{K_d}{n[P0]} + \frac{[Ti]}{n[P0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{K_d}{n[P0]} + \frac{[Ti]}{n[P0]} \right) - 4 \frac{[Ti]}{n[P0]} \right\}^{1/2}$$

L'ajustement des variables  $\Delta\delta_{\max}$ ,  $K_d$  et  $n$  est réalisé à l'aide de l'outil d'analyse de simulation d'Excel afin d'obtenir un paramétrage de courbe au plus proche des points expérimentaux, avec une différence entre les points expérimentaux et les points théoriques la plus petite possible. La figure 63 présente les résultats obtenus en présence de chaque sucre étudié. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11 p.127.

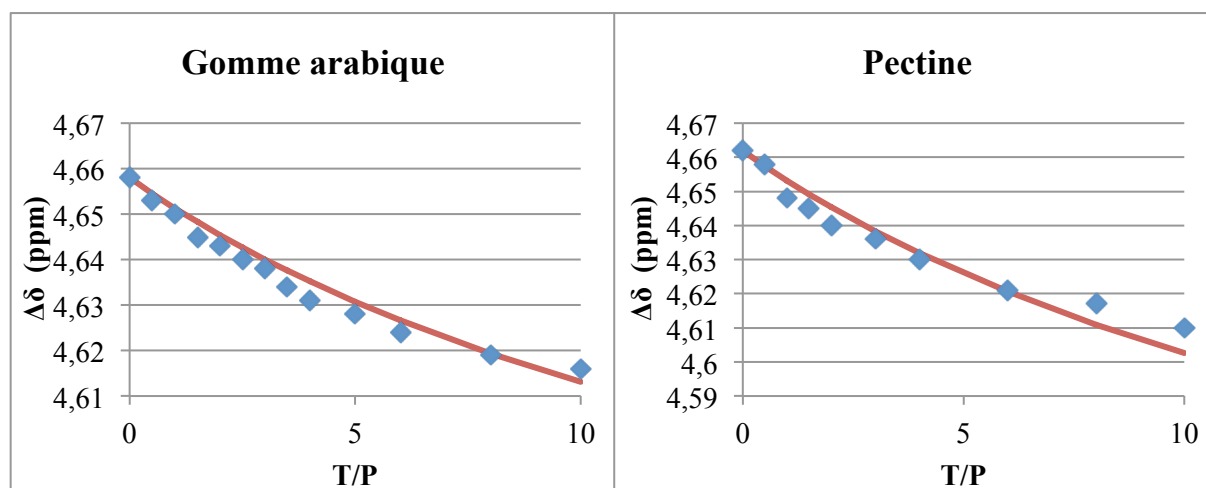


Figure 63 : Variation des déplacements chimiques d'IB9-14 lors d'une titration en EGCG en présence de Gomme arabique (à gauche) et de Pectine (à droite) en fonction du rapport tanins/protéines (T/P). Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation [III-C1<sub>3</sub>] permet d'accéder au  $K_d$  entre le peptide et le tanin. La valeur de  $K_d$  est donnée à  $\pm 5\%$ .

Au regard des valeurs obtenues, en présence ou non de sucre, on constate que la stœchiométrie reste conservée avec en moyenne 3 procyanidines pouvant se fixer sur le peptide IB9-14. De plus la constante de dissociation entre IB9-14 et l'EGCG reste dans tous les cas identique, avec des valeurs de l'ordre de 1 mM.

Ces résultats montrent donc que la présence de glucose, glycérol, pectine ou gomme arabique dans le milieu (aux concentrations typiques des vins rouges de Bordeaux) ne semble pas modifier les paramètres de l'association entre l'EGCG et le peptide salivaire.

Une autre expérience RMN permettant de remonter au calcul de ces constantes est l'expérience DOSY permettant de mesurer le coefficient de diffusion transversal. En effet, comme pour suivre l'auto-association de l'EGCG dans le chapitre précédent, la mesure de l'évolution du coefficient de diffusion peut être également un moyen efficace pour suivre la fixation d'un ligand à son hôte [164].

Étant donné que les masses molaires des deux protagonistes de l'interaction sont proches, (le peptide de 1,3 kDa et l'EGCG 534,37 Da), il est facilement possible de suivre l'évolution du coefficient de diffusion  $D$  du peptide lorsqu'on ajoute du tanin, cette évolution traduisant la fixation des tanins sur le peptide. En effet, lorsque la concentration en tanins augmente, une décroissance progressive du coefficient de diffusion du peptide est observée (Figure 64). Cette diminution du coefficient de diffusion du peptide traduit ainsi l'augmentation de sa taille et montre bien que les tanins se lient au peptide.

De plus, la courbe de l'évolution de cette variation de  $D$  peut également être paramétrée en utilisant la même équation que celle utilisée pour suivre les variations de déplacements chimiques dans laquelle  $\Delta\delta$  correspond à  $\Delta D$  [III-C2<sub>3</sub>], rappelée ci-dessous :

$$\Delta D = \frac{1}{2} \Delta D_{\max} \left( 1 + \frac{Kd}{n[P_0]} + \frac{[T_i]}{n[P_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{Kd}{n[P_0]} + \frac{[T_i]}{n[P_0]} \right) - 4 \frac{[T_i]}{n[P_0]} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Le paramétrage optimum est cette fois-ci obtenu en optimisant les variables  $\Delta D_{\max}$ ,  $Kd$  et  $n$  à l'aide de l'outil d'analyse de simulation du logiciel Excel.

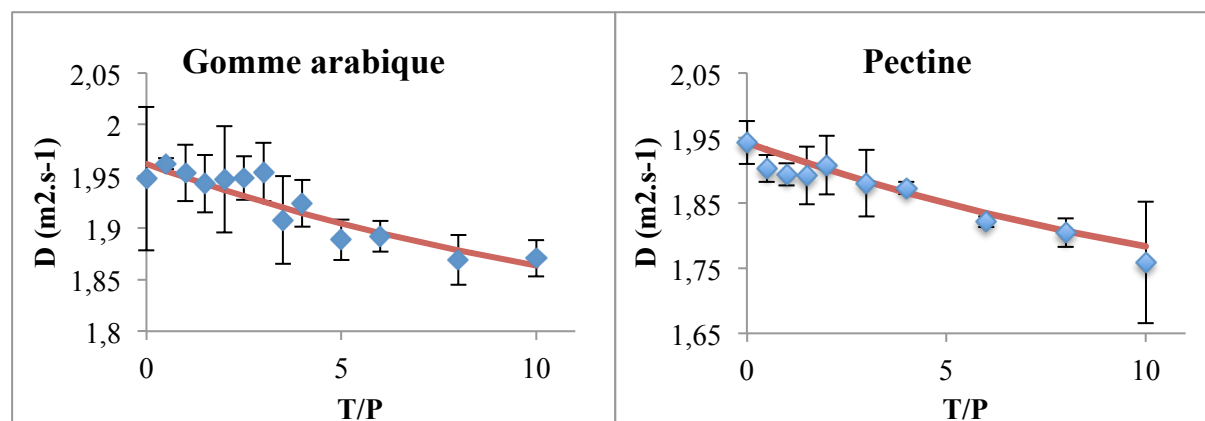


Figure 64 : Variation des coefficients de diffusion d'IB9-14 lors d'une titration en EGCG en présence de gomme arabique (à gauche) et de pectine (à droite) en fonction du rapport tanins/protéines ( $T/P$ ). Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation [III-C2<sub>3</sub>] permet d'accéder au  $Kd$  entre le peptide et le tanin. La valeur de  $Kd$  est donnée à  $\pm 5\%$ .

Le tableau 11 reporte également les valeurs obtenues après le lissage des D expérimentaux. Les estimations des constantes de dissociation obtenues par ces mesures restent du même ordre de grandeur que celles obtenues lors de l'analyse des déplacements chimiques même si la précision des mesures reste meilleure avec l'analyse des déplacements chimiques.

c. Valeur des paramètres d'interactions obtenus

	Avec mesure de $\delta_H$					Avec mesure de D				
	IB9-14 /EGCG seul	+0,1 mM glycérol	+5,6 mM glucose	+1,3 $\mu$ M gomme arabique	+10 $\mu$ M pectine	IB9-14 /EGCG seul	+0,1 mM glycérol	+5,6 mM glucose	+1,3 $\mu$ M gomme arabique	+10 $\mu$ M pectine
<b>Kd (mM)</b> $\pm 5\%$	0,96	0,98	1	1	0,99	0,99	0,98	1,07	1	0,96
<b><math>\Delta_{max}</math> (ppm)</b>	0,21	0,20	0,26	0,19	0,13	0,17	0,17	0,56	0,19	0,30
<b>n</b>	2,9	3	3	3	2,99	3	2,9	3	3	3
<b>RMS</b>	0,0004	0,0001	0,0004	0,0004	0,0003	0,0006	0,003	0,005	0,0002	0,001

Tableau 11 : Valeurs des constantes de dissociation entre EGCG et IB9-14 et du nombre de sites de fixation d'EGCG sur IB9-14 en présence des différents sucres testés.  $\Delta_{max}$  correspond à la variation maximale de déplacement chimique ou de coefficient de diffusion. La précision du Kd est donnée à  $\pm 5\%$  pour les mesures de  $\delta_H$  et à  $\pm 9\%$  pour les mesures de D.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la présence dans le milieu des différents sucres aux concentrations testées ne provoque aucune modification de l'association entre le peptide IB9-14 et l'EGCG.

En effet en présence ou non de sucre, la stoechiométrie du complexe reste identique avec 3 EGCG fixés par peptide, les sites d'interactions restent inchangés au niveau des prolines 2, des prolines 9 et 10 et des glycines 13 et 14 terminales et la constante de dissociation du complexe reste inchangée de l'ordre d'1 mM dans la limite de l'erreur expérimentale.

En revanche, comme lors de l'étude du comportement colloïdal de l'EGCG, une étude plus fine des spectres montre également une diminution de l'intensité et un déplacement chimique des signaux des protons des différents sucres lors de la titration en EGCG. Une interaction entre sucres et tanins semble donc également avoir lieu en présence du peptide IB9-14.

Pour mettre en évidence cette interaction, une analyse quantitative de l'ensemble des signaux représentatif des sucres en présence du peptide a été réalisée.

### 3. Titration de l'EGCG : analyse des signaux des sucres

De la même manière que lors de l'étude du comportement colloïdal de l'EGCG en absence du peptide (cf. chapitre IV), une diminution de l'aire des massifs de pics spécifiques aux sucres ainsi qu'un déplacement chimique des protons associés à ces pics est de nouveau visible en présence du peptide lors des différentes titrations en EGCG.

Nous allons à nouveau, dans cette partie, étudier cette baisse de manière quantitative en présence du peptide IB9-14.

#### a. Analyse quantitative des signaux

Pour l'ensemble des titrations de l'EGCG en présence du peptide IB9-14 et en présence de glucose, gomme arabique et pectine, l'intégration des pics spécifiques de chaque sucre a été réalisée. Les intégrales ont été mesurées entre 3,8 et 3,55 ppm ainsi que 3,45 et 3,2 ppm pour le glucose (ensemble des protons de la structure), entre 4,3 et 3,55 ppm pour la gomme arabique (proton H2 à H6', H5 et H1 axial de la chaîne principale et résonances des protons des chaînes latérales), et entre 4,2 et 3,6 ppm pour la pectine (contenant les signaux des protons H1, H2, H4, H5 des unités d'acide galacturonique ainsi que des résonances des chaînes latérales). Ces intégrations ont été normalisées en se basant comme précédemment sur le signal résiduel de l'éthanol (cf. chapitre IV-D1).

Ainsi en présence du peptide salivaire, la mesure de ces intégrales pour chaque sucre étudié permet de mettre en évidence une diminution de l'intensité des signaux spécifiques des sucres en solution au cours de l'addition de l'EGCG. Cette baisse est visible sur les courbes représentant la variation du pourcentage d'aires des pics de sucres étudiés en fonction de la concentration en EGCG (Figure 65).

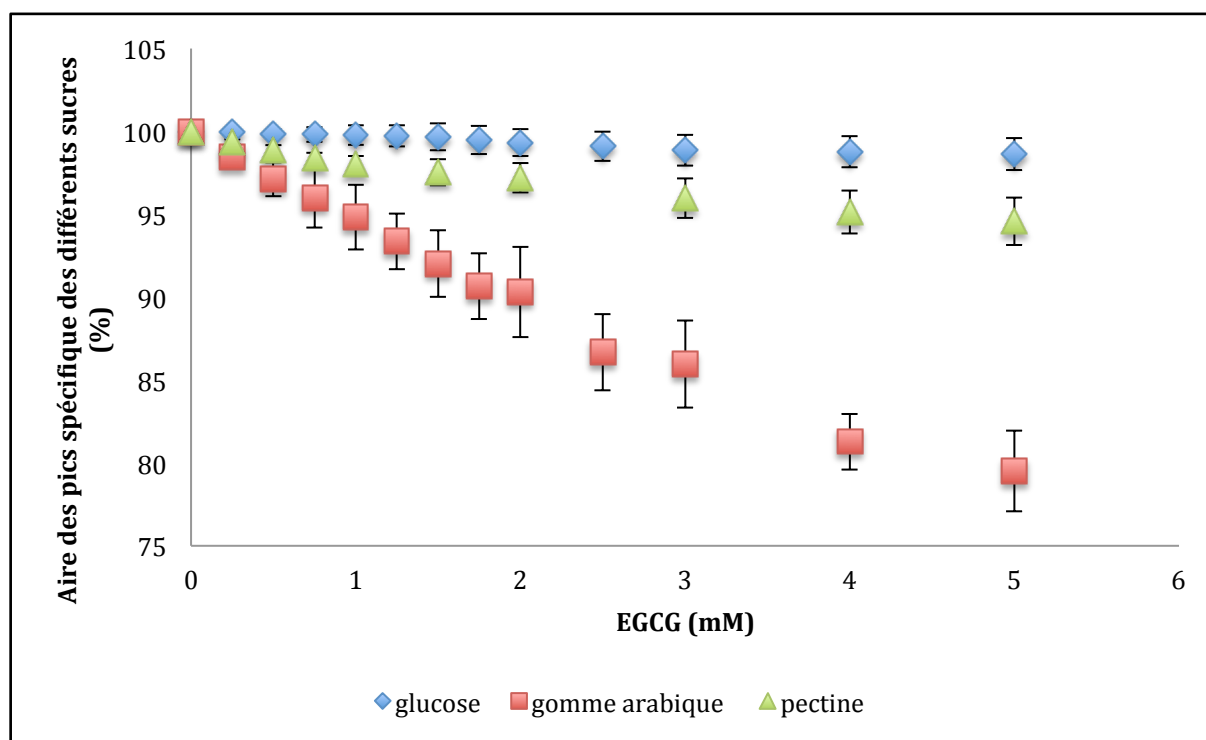


Figure 65 : Baisse de l'intensité des signaux des sucres lors de la titration en EGCG entre 0 et 5mM en présence de 0,5mM d'IB9-14.

La baisse maximale d'intensité du signal de chaque sucre, observée dans ces conditions en présence du peptide, est de l'ordre de 2% pour le glucose, 6% pour la pectine et 20% pour la gomme arabique. Cette baisse est similaire à celle observée en absence du peptide salivaire lors de l'étude du comportement colloïdal de l'EGCG (cf. chapitre IV), puisqu'à 5 mM en EGCG en absence de peptide une baisse de 2% pour le glucose, 5% pour la pectine et 23% pour la gomme arabique était observée.

Cette baisse d'intensité du signal peut comme en absence du peptide s'expliquer par la formation de complexes entre sucres et tanins. Cette baisse peut alors être analysée selon un modèle d'interaction de type  $T+S \rightleftharpoons TS$  pour lequel l'intensité du signal que l'on mesure est proportionnel à la concentration en sucres libres (cf. chapitre IV-C1).

L'analyse et le paramétrage de ces baisses de signaux à l'aide de l'équation IV-D1 permet ainsi de remonter à la constante de dissociation entre chaque sucre étudié et l'EGCG en présence du peptide (Figure 66).

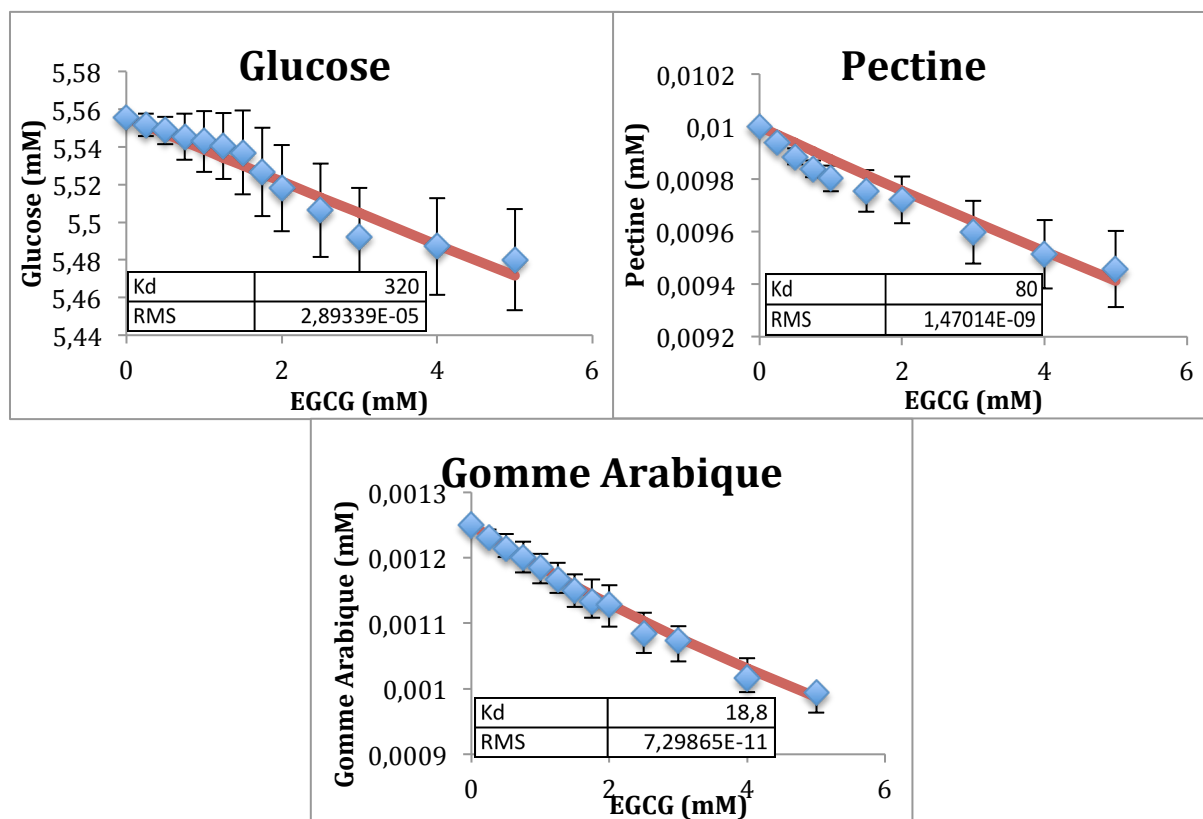


Figure 66 : Baisse de la quantité de chaque sucre lors de la titration en EGCG entre 0 et 5 mM en présence de 0,5 mM en peptide IB9-14. Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation IV-D1 permet d'accéder au  $K_d$  entre le sucre et le tanin. La valeur de  $K_d$  est donnée à  $\pm 10\%$ .

L'ensemble des valeurs de  $K_d$  ainsi déterminées pour chaque sucre est rassemblé dans le tableau 12 p.131.

Ces mesures ne présentent pas l'apparition d'une saturation (« plateau » sur les courbes) et ne peuvent pas donner lieu à des calculs précis de  $K_d$ . Néanmoins elles permettent d'affirmer que les  $K_d$  sont supérieures aux valeurs trouvées ( $\geq 315$  mM pour le glucose,  $\geq 80$  pour le glycérol et  $\geq 90$  pour la pectine).

#### b. Valeurs des constantes de dissociation obtenues

Les résultats de  $K_d$  ainsi obtenus à partir des analyses quantitatives et de déplacements chimiques des sucres lors de la titration de l'EGCG en présence du peptide salivaire IB9-14 montre des résultats similaires. L'ensemble des résultats est donné dans le tableau 12.

	<b>Kd (mM) obtenus par analyse quantitative en présence d'IB9-14 (<math>\pm 10\%</math>)</b>	<b>Kd (mM) obtenus par analyse quantitative en absence d'IB9-14 (<math>\pm 10\%</math>)</b>
<b>Glucose</b>	$\geq 320$	$\geq 315$
<b>Pectine</b>	$\geq 80$	$\geq 80$
<b>Gomme arabique</b>	19	20

*Tableau 12 : Valeur des constantes de dissociation Kd entre les différents sucres étudiés et l'EGCG en présence de 0,5 mM en peptide IB9-14, obtenues par analyses quantitatives ou par analyses de déplacements chimiques.*

L'ensemble de ces résultats est à comparer avec les valeurs de Kd obtenues en absence du peptide salivaire (cf. chapitre IV-C3) qui étaient de 315, 90 et 20 mM respectivement pour le glucose, la pectine et la gomme arabique.

Le fait de retrouver des valeurs identiques en présence ou absence du peptide salivaire IB9-14 confirme la présence d'interactions spécifiques entre sucres et tanins similaires qui ne perturbent pas l'interaction entre tanins et protéines. En effet les Kd entre ces deux types de complexes étant très différents, la concentration de tanins susceptible d'interagir avec la protéine est à peine modifiée en présence de sucres.

Ainsi, comme en absence du peptide, les sucres simples comme le glucose présentent de faibles affinités pour le tanin alors que les polysaccharides tels la pectine et la gomme arabique présentent de plus fortes affinités. Cependant ces valeurs restent, dans tous les cas, plus faibles, d'un ordre de grandeur au moins, que les affinités entre l'EGCG et le peptide IB9-14.

#### 4. Titration de la Gomme arabique : analyse des signaux de l'EGCG

De la même manière que pour l'étude du comportement colloïdal de l'EGCG, la gomme arabique a été choisie par la suite pour l'étude d'une titration dans un tampon contenant une concentration fixe en EGCG en présence de 0,5 mM de peptide IB9-14. Deux concentrations en EGCG ont été choisies une en-dessous de la CMC (1 mM) et une au-dessus de la CMC (10 mM).

Pour chaque concentration un titrage par addition de gomme arabique entre 0 et 2,1  $\mu\text{M}$  a été effectué. Des analyses quantitatives des signaux de l'EGCG et du peptide IB9-14 ont cette fois-ci été réalisées.

##### a. Analyse quantitative des signaux de l'EGCG

Une étude par intégration des signaux des protons 2''6'' et 2'6' ainsi que des protons 6 et 8 de l'EGCG résonnant respectivement à 6,85 ppm, 6,47 ppm ainsi qu'à 5,98 ppm et 5,84 ppm a pu être réalisée afin de quantifier la baisse de l'intensité des signaux de l'EGCG au fur et à mesure de l'ajout de gomme arabique (Figure 67).

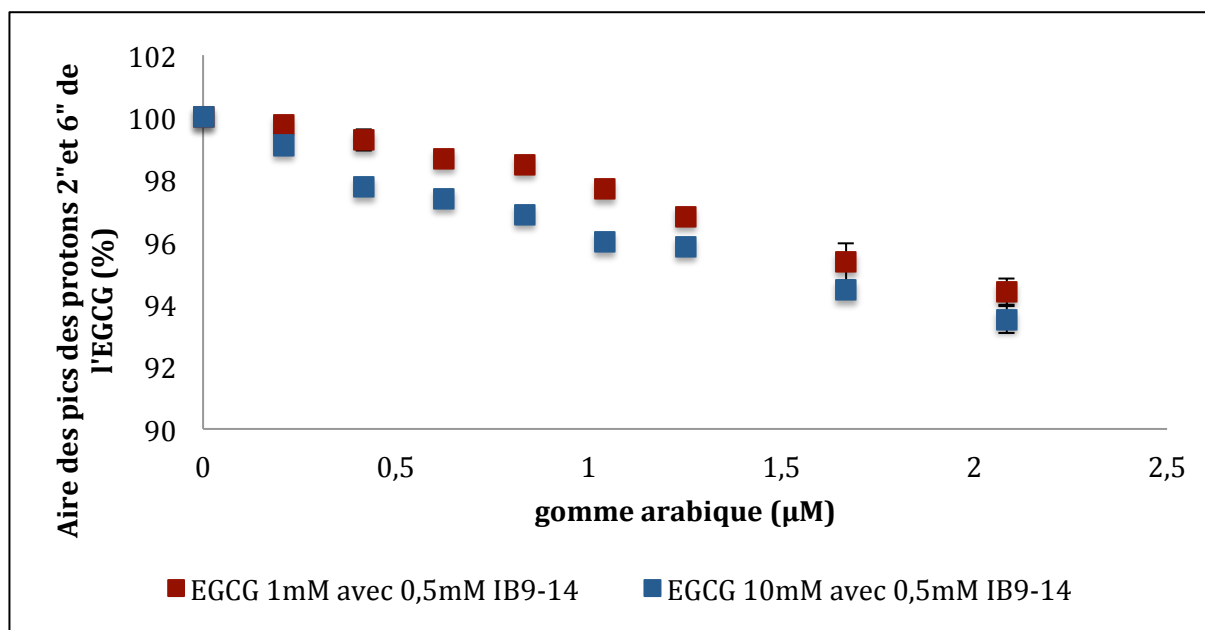


Figure 67 : Baisse observée de l'intensité des signaux de l'EGCG au cours de la titration en gomme arabique entre 0 et 2,1  $\mu\text{M}$ . Les mesures sont réalisées par intégration des massifs spécifiques des protons 6''2'' 2'6', 6 et 8 de l'EGCG.



Dans ces deux cas, en-dessous et au-dessus de la CMC de l'EGCG, une diminution de l'intensité des signaux est observée en présence comme en absence du peptide, suggérant qu'une partie de l'EGCG n'est plus observable par RMN des liquides du fait de son association avec la gomme arabique. Cette interaction est donc également indépendante de la présence du peptide.

#### b. Analyse quantitative des signaux du peptide

L'intensité des signaux du peptide a également été suivie au cours de la même titration en gomme arabique. Pour cela, une intégration des signaux du peptide au niveau de la lysine 5 a été réalisée pour chaque concentration en sucres (Figure 68).

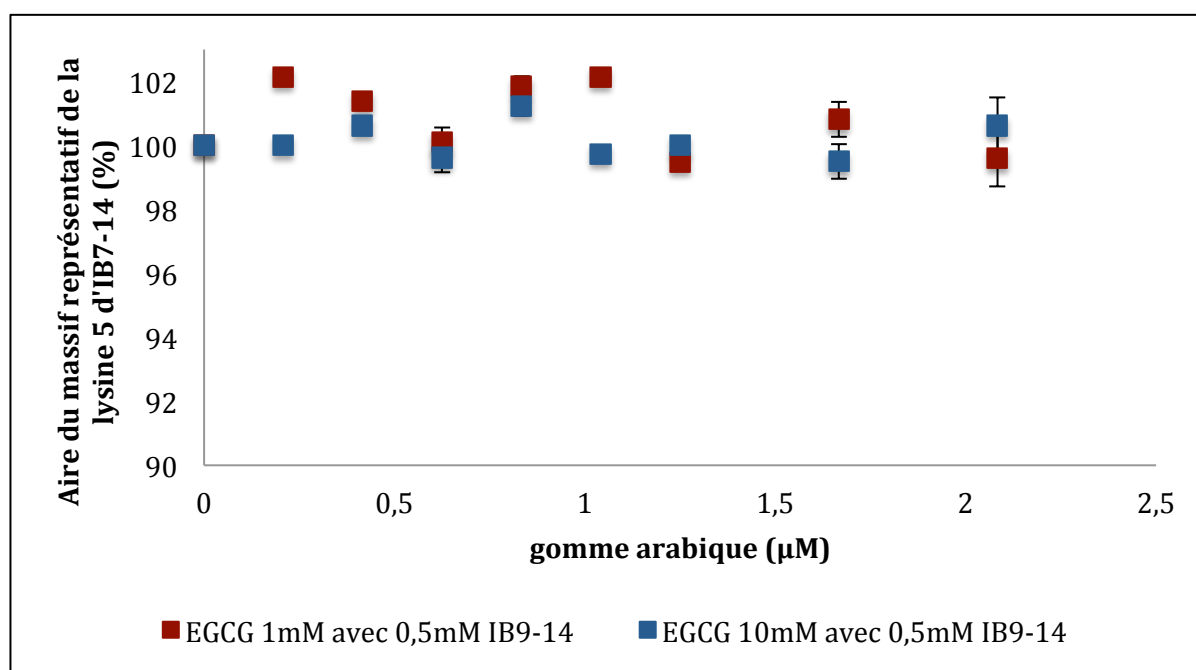


Figure 68 : Variation observée de l'intensité du signal de la lysine 5 du peptide au cours de la titration en gomme arabique entre 0 et 2,1  $\mu\text{M}$ . Les mesures sont réalisées par intégration des massifs spécifiques de la lysine 5.

Dans ce cas, aucune diminution de l'intensité des résonances du peptide n'est observée, suggérant bien que celui-ci ne présente pas le même comportement que les tanins et n'interagit pas avec la gomme arabique.

Cela confirme donc que les sucres étudiés aux concentrations choisies n'interagissent qu'avec les tanins et non pas avec le peptide IB9-14, ni avec les complexe peptides-tanins

c. Bilan sur l'évolution de l'intensité des signaux de l'EGCG et du peptide

La diminution des signaux des protons de l'EGCG observée lors la titration en gomme arabique en présence du peptide IB9-14 confirme la formation de complexes colloïdaux tanins-sucres de taille comprise entre 15 nm et 1  $\mu$ m comme le laisse suggérer la disparition du signal en RMN liquide [179].

Les signaux du peptide quant à eux ne présentent aucune variation d'intensité au cours de la titration : ceci confirme que ni le peptide, ni les complexes tanins-protéines n'interagissent avec la gomme arabique. Seules les molécules d'EGCG interagissent avec le sucre.

Ces observations étant, comme en absence du peptide, similaires au-dessus et en-dessous de la CMC de l'EGCG, le sucre semble toujours interagir avec les tanins quelque soit leur état (colloïdal ou non) et cela sans modifier l'interaction tanins-protéines aux concentrations testées.

## 5. Discussion sur l'effet des sucres testés

De nombreuses études ont été réalisées ces dernières années afin d'observer l'effet de polysaccharides sur les interactions entre protéines salivaires et polyphénols. L'ensemble de ces études présentent toutes un effet inhibiteur de nombreux polysaccharides sur les interactions entre tanins et protéines, avec des effets plus ou moins importants en fonction des sucres et des protéines utilisées [94]. Deux mécanismes d'interaction ont été proposés dans ces études. Dans un cas les polysaccharides pourraient former des complexes tertiaires avec les agrégats tanins-protéines (cas de la pectine), ou dans un second cas, ils pourraient présenter une plus forte affinité pour les tanins et les encapsuler en dissociant les complexes tanins-protéines (cas de la gomme arabique et du Xanthan). Dans les deux cas, ces mécanismes aboutissent à la solubilisation des complexes [145, 146].

Grand nombre de ces études ayant été réalisées sur des extraits salivaires et des extraits de polyphénol, il nous a semblé important d'étudier l'impact de sucres « modèles » moins complexes sur l'interaction entre un peptide salivaire modèle IB9-14 et un polyphénol modèle l'EGCG.

Ainsi dans ce chapitre, l'observation de la baisse à la fois des signaux des sucres et des tanins lors des différentes titrations en présence du peptide IB9-14 a permis de mettre en évidence la formation de particules colloïdales tanins-sucre dans les mêmes proportions que celles observées en absence du peptide. Ces disparitions de signaux étant liées à l'apparition d'interactions de type solides (couplages dipolaires) [179] (cf. chapitre IV-G).

Le suivi de la disparition du signal de la gomme arabique au cours de la titration en EGCG a permis de mesurer les constantes de dissociation des différents complexes EGCG-sucre formés. Les valeurs mesurées sont semblables à celles observées en absence du peptide (cf. chapitre IV-C 2) avec une plus forte affinité observée pour la gomme arabique ( $K_d$  de 19 mM). Cette observation semble toujours en accord avec l'étude de Soares *et al* en 2012 qui mettaient en évidence une dissociation entre PRPs et tanins condensés par un phénomène de compétition à travers la fixation de tanins sur la gomme arabique [146].

En revanche dans ce chapitre il a également été démontré que dans les conditions de concentrations utilisées, la présence de gomme arabique ne provoque aucune variation de l'intensité des signaux du peptide, traduisant l'absence d'interaction avec la gomme arabique.

De plus, l'interaction entre EGCG et sucres présente des  $K_d$  très différents de ceux observés entre EGCG et peptide (respectivement 20 à plus de 315 mM contre 1 mM)

traduisant le fait que la concentration de tanins susceptible d'interagir avec le peptide n'est quasiment pas modifiée et justifie la stabilité des constantes d'interactions tanins-peptides même en présence de sucres.

Ainsi, même si l'observation de la dissociation entre polyphénol et tanins n'a pas été mise en évidence comme dans l'étude de Soares [146], une forte augmentation de la concentration en gomme arabique pourrait probablement déplacer l'équilibre et l'induire.

Comme en absence du peptide, les observations étant similaires en dessous et au-dessus de la CMC de l'EGCG, l'interaction entre l'EGCG et la gomme arabique a lieu indépendamment de son état colloïdal, et confirme ainsi l'absence d'effet sur le comportement colloïdal de l'EGCG.

Ainsi, l'ensemble de ces données et de ces conclusions nous a finalement permis de mettre en évidence un nouveau schéma d'interaction entre l'EGCG et un peptide salivaire modèle (IB9-14) en présence de sucres (Figure 69).

Dans ce modèle, les sucres quels qu'ils soient (simples ou polysaccharides) peuvent interagir avec les molécules d'EGCG de la même manière qu'en absence de peptide (cf. chapitre IV-G) avec des constantes de dissociation allant de 315 à 20 mM en fonction de la longueur de la chaîne polysaccharide (cf. échelle d'interaction chapitre IV-G). D'autre part les  $K_d$  entre EGCG et sucres étant fortement différents du  $K_d$  entre le peptide et l'EGCG (au moins d'un facteur 20), la formation de colloïdes EGCG-sucre n'impacte en aucun cas la formation de complexe peptides-EGCG, qui est favorisé par une plus grande affinité de l'EGCG pour le peptide IB9-14. L'interaction entre le peptide et l'EGCG se réalise donc de la même manière que le décrivait Cala *et al* [65] avec présence d'interaction spécifique pour des concentrations en polyphénols inférieures à sa CMC et des interactions non spécifiques pour des concentrations supérieures à la CMC.

Pour conclure, l'étude réalisée dans ce chapitre a permis de proposer un nouveau schéma d'interaction entre un peptide salivaire modèle, IB9-14, et une procyanidine modèle, l'EGCG en présence de différents sucres simples (glucose) ou polysaccharides (gomme arabique et pectine). Une interaction entre sucres et polyphénols, identique à celle observée en absence de peptide a été mise en évidence mais elle n'engendre aucune modification de l'interaction entre le peptide salivaire et l'EGCG dans les conditions expérimentales testées.

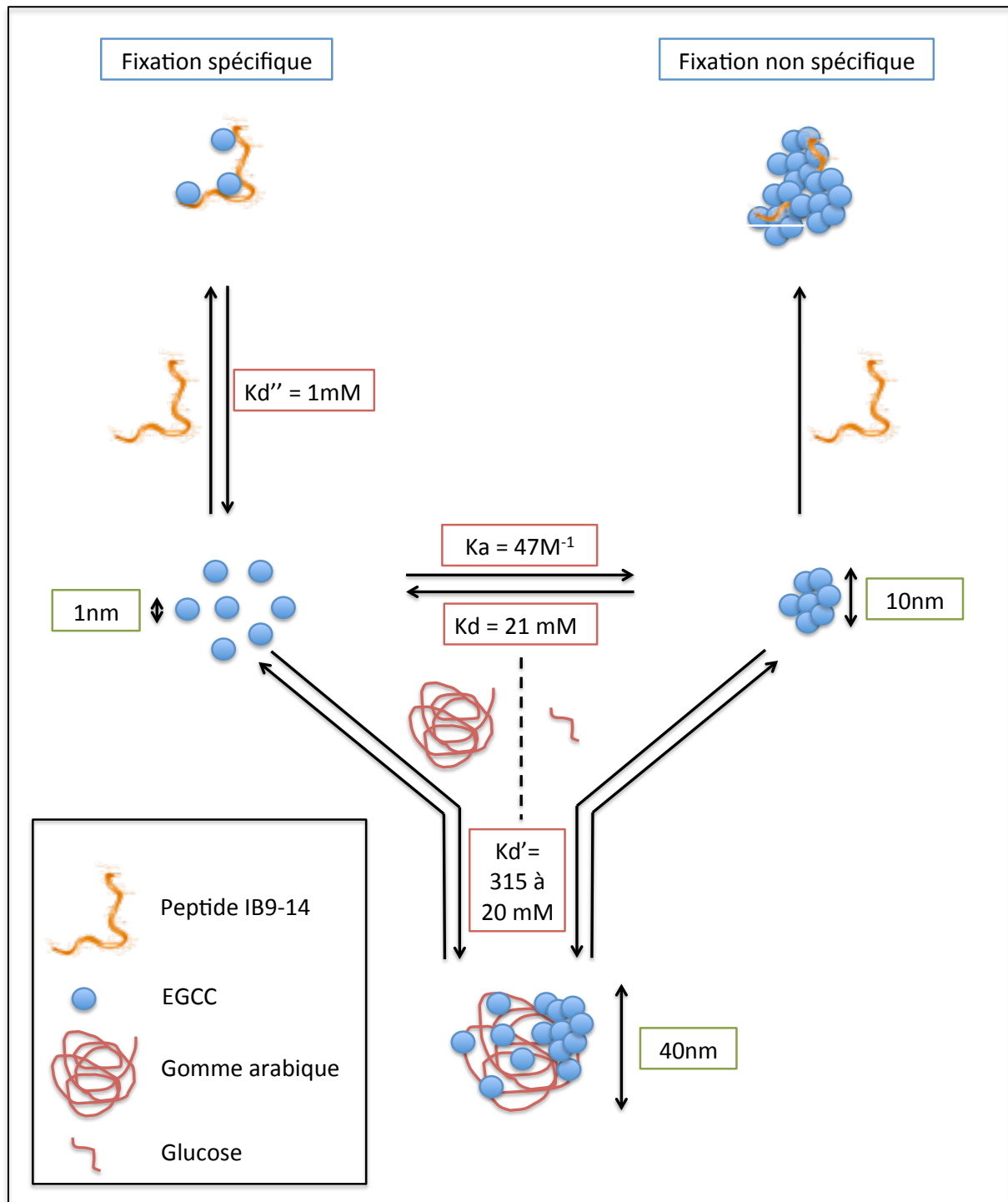


Figure 69 : Nouveau schéma d'auto-association de l'EGCG en présence de sucres. L'affinité entre le peptide salivaire IB9-14 et l'EGCG étant plus forte que l'affinité EGCG-sucre, l'interaction tanins peptide n'est pas affectée par la présence de sucre. Le sucre peut quand à lui interagir avec les tanins libres en solution et cela avec la même affinité en dessous et au dessus de la CMC de l'EGCG.

## C-Etude de la protéine IB9-61

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'influence de la taille de la protéine sur son affinité vis-à-vis de différents tanins, après avoir réalisé une première attribution de cette protéine.

Il existe, en effet, des travaux récents qui semblent montrer l'influence de la taille de la protéine utilisée sur l'affinité [102] : la protéine entière aurait une affinité mille fois plus forte qu'un simple peptide représentatif de la séquence répétée. De plus, une étude de Cala *et al* au laboratoire s'est orientée sur un peptide IB9-37 de taille intermédiaire entre le peptide IB9-14 et la protéine complète IB9 [65]. Cette étude a mis en évidence que le nombre de tanins et de sites de fixation impliqué dans l'interaction n'était pas proportionnel à la taille du peptide. En effet même si IB9-37 possède potentiellement 3 fois plus de sites de fixation pour les tanins, il ne fixe plus que 2 molécules de tanins avec une affinité plus forte que celle observée pour le peptide IB9-14. Cet effet est expliqué par un changement conformationnel du peptide qui enveloppe les molécules de tanins (Figure 70).

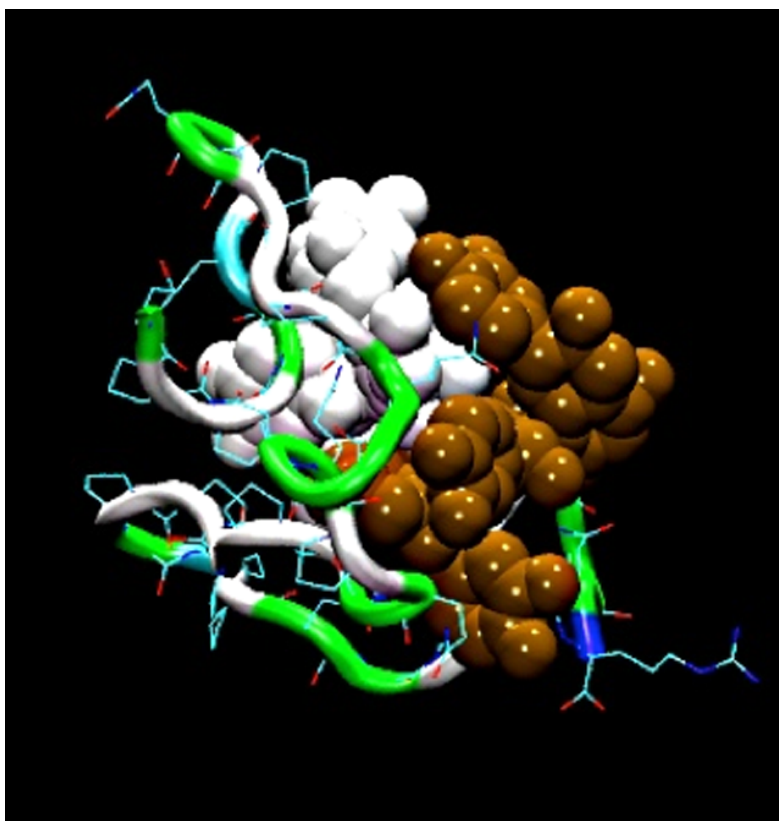


Figure 70 : Visualisation du complexe entre 2 procyanidines C2 (Blanc et marron) et le peptide IB9-37 (Vert) obtenue par dynamique moléculaire sur 66 ns de temps de calcul dans une boîte d'eau de 100Å de côté. D'après Cala *et al* 2012 [65].

Dans ce chapitre, l'affinité de la protéine IB9-61 pour deux procyanidines différentes : l'EGCG et le dimère B3 a été étudiée, en utilisant les mêmes méthodes RMN que précédemment pour le peptide IB9-14 (Chapitre V-B).

L'étude de cette protéine a été réalisée en 3 étapes : une première ébauche de l'attribution des résonances de la protéine, une étude de l'interaction des deux procyanidines avec la protéine et une première approche de l'impact d'ajout de sucres sur les interactions.

## 1. Attribution partielle des résonances de la protéine

L'attribution de la protéine complète a été réalisée en suivant la même méthodologie que précédemment pour le peptide IB9-14 (chapitre IV-B1)

La RMN du proton 1D et 2D TOCSY a été utilisée afin d'attribuer les différents systèmes de spin correspondant aux différents acides aminés de la protéine. Ces différents spectres ont été enregistrés à 900 MHz à Gif sur Yvette (dans le cadre d'un projet TGIR).

Comme pour le peptide IB9-14, deux régions restent capitales pour l'attribution de l'ensemble des résonances des acides aminés de la protéine IB9-61. La région montrant la corrélation entre les NH et les protons de la chaîne latérale ( $H\alpha$ ,  $H\beta$ ,  $H\gamma$ ,  $H\delta$ ,  $H\epsilon$ , NH secondaires) (entre 8,6 – 7,8 ppm en F2 et 8 – 0 ppm en F1) permettant d'attribuer tous les acides aminés ayant une fonction NH et la région montrant les corrélations entre les protons  $H\alpha$  et les protons de la chaîne latérale des prolines ( $H\beta$ ,  $H\gamma$ ) (entre 3 – 1 ppm en F2 et 3 – 6 ppm en F1) permettant l'attribution des prolines.

De plus, la protéine IB9 n'étant pas structurée et les peptides IB9-14 et IB9-37 déjà attribués au laboratoire étant des fragments constitutifs de cette protéine, ils ont pu servir de support et de point de départ pour l'attribution de cette protéine complète.

Une attribution de la protéine IB9 a donc été possible grâce à la bonne superposition entre ses spectres TOCSY/NOESY avec ceux des peptides IB9-14 et IB9-37 (Figure 71) En effet, la dispersion limitée des déplacements chimiques observée et les homologies entre les signaux des protons avec les peptides plus courts sont des éléments qui confirment sans aucun doute la nature non structurée de la protéine.



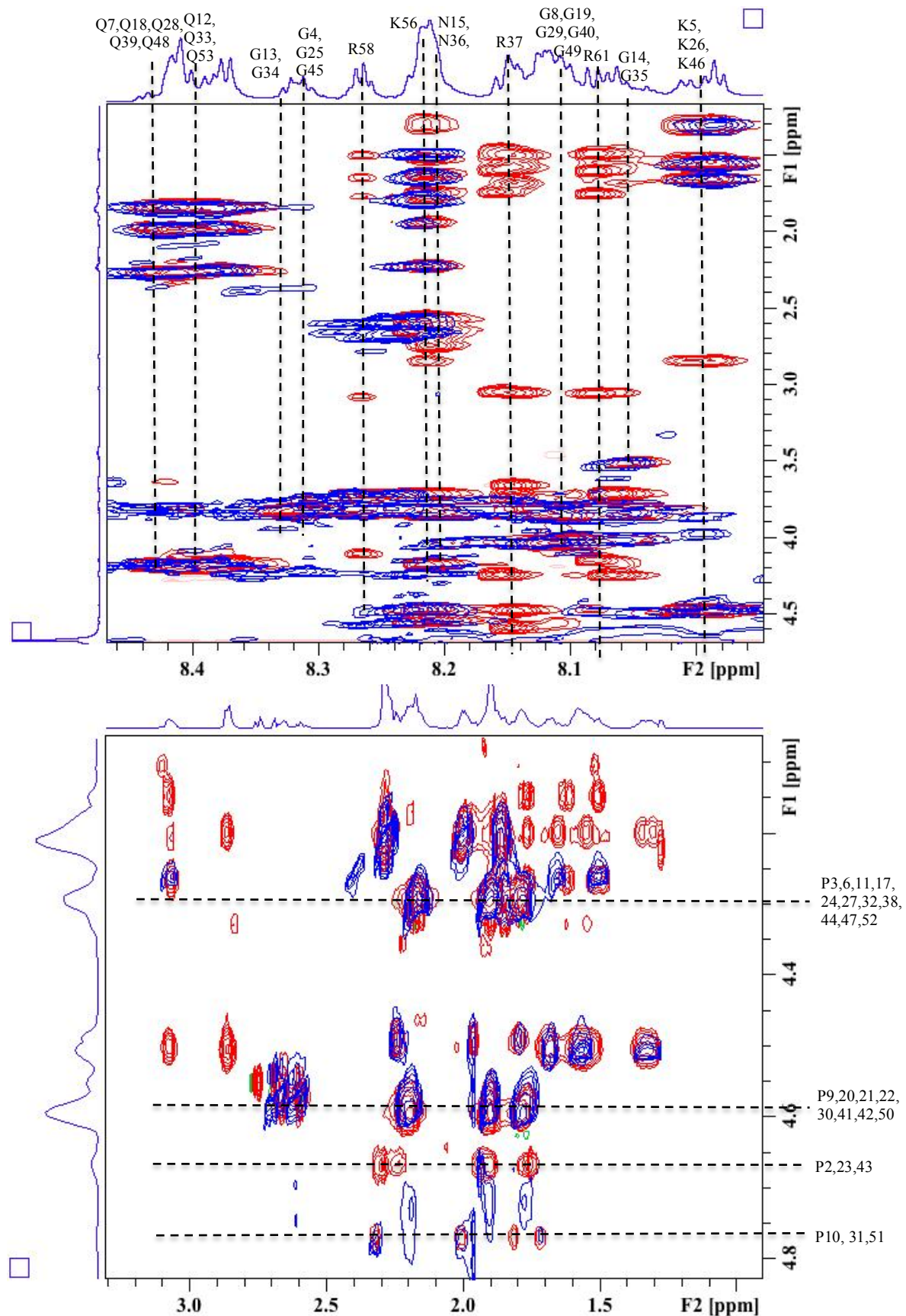


Figure 71 : Superposition des cartes Tocsy de la protéine IB9-61 (en rouge) et du peptide IB9-37 (en bleu). Le spectre du haut correspond à la zone des NH amides des peptides et celui du bas aux régions des résidus proline.

Ainsi, les acides aminés ayant le même environnement chimique dans les deux peptides et la protéine auront un déplacement chimique identique.

Les résidus de la protéine complète peuvent alors être répertoriés en groupe de résidus ayant exactement le même environnement et donc des résonances identiques ou presque. (Figure 72)

$S^1P^2P^3G^4K^5P^6Q^7G^8P^9P^{10}P^{11}Q^{12}G^{13}G^{14}N^{15}Q^{16}P^{17}Q^{18}G^{19}P^{20}P^{21}P^{22}P^{23}P^{24}G^{25}$ $K^{26}P^{27}Q^{28}G^{29}P^{30}P^{31}P^{32}Q^{33}G^{34}G^{35}N^{36}R^{37}P^{38}Q^{39}G^{40}P^{41}P^{42}P^{43}P^{44}G^{45}K^{46}P^{47}Q^{48}G^{49}P^{50}$ $P^{51}P^{52}Q^{53}G^{54}D^{55}K^{56}S^{57}R^{58}S^{59}P^{60}R^{61}$		
Groupe de résidus avec des environnements chimiques identiques ou très proches :		
Q12-Q33-Q53 Q7-Q18-Q28-Q39-Q48 G8-G19-G29-G40-G49 G4-G25-G45 G13-G34 G14-G35 K5-K26-K46 N15-N36	P2-P23-P43 P3-P24-P44 P6-P17-P27-P38-P47 P9-P20-P30-P41-P50 P11-P32-P52 P10-P31-P51 P21-P22-P42	Reste isolé :  S1; Q16; R37; G54; D55; K56; S57; R58; S59; P60; R61

Figure 72 : Séquence de la protéine IB9-61 et découpage des résidus en groupes ayant un environnement chimique identique ou très proche.

Ainsi, malgré un fort recouvrement des signaux lié au nombre restreint d'acides aminés dans la séquence de la protéine (Glycine, Proline, Glutamine représentent à eux seuls plus de 80% des résidus) et à la présence d'une séquence répétée 3 fois, une première attribution a pu être réalisée.

En effet, les regroupements de résidus précédents, associés à la superposition entre les spectres 2D TOCSY/NOESY de la protéine et ceux des peptides IB9-14 et IB9-37 ont facilité l'attribution des résidus communs aux deux peptides (Figure 71).

En revanche de nouvelles taches de corrélations apparaissent également. Du côté des NH amides, elles peuvent correspondre aux résidus de bout de chaîne de la protéine. En effet, ces résidus s'organisent en une séquence nouvelle, non répétée dans les autres peptides, provoquant un isolement des résidus liés à un environnement chimique différent. Du côté des

résidus proline, des nouvelles tâches de corrélation apparaissent aussi. Elles peuvent correspondre à la fois aux résonances des protons des chaînes latérales des nouveaux résidus du bout de chaîne et aux nouveaux résidus proline présents dans IB9-61, qui en compte 26 contre seulement 16 pour IB9-37. Par exemple, la proline 60 entourée de serine et d'arginine présente un environnement chimique différent de ceux observés dans les peptides IB9-14 et IB9-37. Ainsi en tenant compte de l'attribution des peptides IB9-14 et IB9-37 et de ces remarques, une attribution des résonances du peptide IB9-61 a pu être réalisée par homologie. (Tableau 13).

	N-H	Ha	Hb1	Hb2	Hg	Hd	He
<b>Serine 1</b>		4,29	3,72	3,54			
<b>Proline 2</b>		4,65	2,31	1,75	1,96	3,48 / 3,66	
<b>Proline 3</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glycine 4</b>	8,31	3,82					
<b>Lysine 5</b>	8,00	4,53	1,69		1,33	1,57	3,83
<b>Proline 6</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 7</b>	8,45	4,21	1,99	1,85	2,29		
<b>Glycine 8</b>	8,14	4,05					
<b>Proline 9</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 10</b>		4,75	2,30	1,95	1,77	3,42	
<b>Proline 11</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 12</b>	8,40	4,18	1,99	1,86	2,26		
<b>Glycine 13</b>	8,34	3,83					
<b>Glycine 14</b>	8,06	3,82					
<b>Asparagine 15</b>	8,20		2,66	2,56	4,64		
<b>Glutamine 16</b>	8,48	4,48	1,94	1,87	2,27		
<b>Proline 17</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 18</b>	8,45	4,21	1,99	1,85	2,29		
<b>Glycine 19</b>	8,14	4,05					
<b>Proline 20</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 21</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 22</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 23</b>		4,65	2,31	1,75	1,96	3,48 / 3,66	
<b>Proline 24</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glycine 25</b>	8,31	3,82					
<b>Lysine 26</b>	8,00	4,53	1,69		1,33	1,57	3,83
<b>Proline 27</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 28</b>	8,45	4,21	1,99	1,85	2,29		
<b>Glycine 29</b>	8,14	4,05					
<b>Proline 30</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 31</b>		4,75	2,30	1,95	1,77	3,42	
<b>Proline 32</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	

Chapitre V  
Effet des sucres sur les interactions tanins-protéines

<b>Glutamine 33</b>	8,40	4,18	1,99	1,86	2,26		
<b>Glycine 34</b>	8,34	3,83					
<b>Glycine 35</b>	8,06	3,82					
<b>Asparagine 36</b>	8,21		2,84	2,75			
<b>Arginine 37</b>	8,15	4,11	1,78	1,65	1,50	3,08	7,04
<b>Proline 38</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 39</b>	8,45	4,21	1,99	1,85	2,29		
<b>Glycine 40</b>	8,14	4,05					
<b>Proline 41</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 42</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 43</b>		4,65	2,31	1,75	1,96	3,48 / 3,66	
<b>Proline 44</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glycine 45</b>	8,31	3,82					
<b>Lysine 46</b>	8,00	4,53	1,69		1,33	1,57	3,83
<b>Proline 47</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 48</b>	8,45	4,21	1,99	1,85	2,29		
<b>Glycine 49</b>	8,14	4,05					
<b>Proline 50</b>		4,57	2,20	1,80	1,91	3,49/3,68	
<b>Proline 51</b>							
<b>Proline 52</b>		4,29	2,18	1,78	1,91	3,57 / 3,71	
<b>Glutamine 53</b>	8,40	4,18	1,99	1,86	2,26		
<b>Glycine 54</b>	8,18	3,65	3,73				
<b>Aspartate 55</b>	8,21		2,84	2,75			
<b>Lysine 56</b>	8,25	4,17	1,61		1,30	1,53	2,85
<b>Serine 57</b>		4,44	3,60	3,57			
<b>Arginine 58</b>	8,27	4,23	1,74	1,58	1,49	3,04	7,06
<b>Serine 59</b>		4,62	3,76	3,67			
<b>Proline 60</b>		4,26					
<b>Arginine 61</b>	8,08	4,14	1,75	1,60	1,48	3,05	7,04

Tableau 13 : Déplacements chimiques des protons en ppm du peptide IB9-61 obtenu à 950 MHz, à 298K, pH 3,5 avec 1 mM d'IB9-61 dans un milieu hydroalcoolique H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/EtOD (80/8/12, v/v/v)

## 2. Etude de l'interaction avec différents tanins

Suite à la synthèse et l'attribution d'une majorité des résonances proton d'IB9-61, une première étude a été de tester l'interaction de deux procyanidines (EGCG et B3) sur cette dernière.

### a. Analyse des variations de déplacements chimiques et calcul de $K_d$

Tout comme pour le peptide IB9-14, lors de l'ajout croissant de tanin à une solution de protéine (0,5 mM), une variation de déplacement chimique importante pour certains protons des acides aminés du peptide est observée, alors qu'aucune variation significative n'est observée au niveau du tanin (Figure 73).

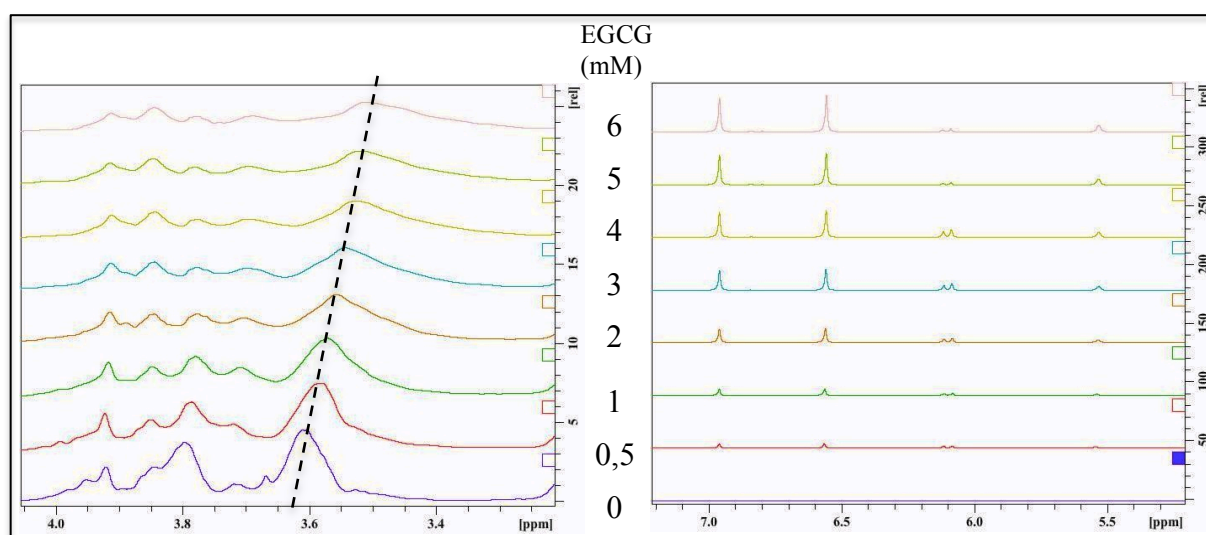


Figure 73 : Spectre proton de la région des résidus proline d'IB9-61 (à gauche) et de la région des protons catéchols de l'EGCG (à droite) représentant la variation des déplacements chimiques (ppm) au cours de la titration en EGCG entre 0 et 6 mM. Les pointillés représentent le déplacement chimique du H $\delta$  d'une proline du peptide IB9-61.

L'étude de ces déplacements chimiques a permis de calculer une constante de dissociation entre la protéine complète et chaque procyanidine. Pour cela, les variations de déplacements chimiques du H $\delta$  d'une proline (3,57 ppm) et du H $\beta$  de l'aspartate 55 (2,89 ppm) lors de titration respective en EGCG et en procyanidine B3 ont été paramétrées en utilisant l'équation [III-C1<sub>3</sub>] (Figure 74).

Tout comme pour l'étude du peptide IB9-14, les variables  $\Delta\delta_{\max}$ ,  $K_d$  et  $n$  sont optimisées à l'aide de l'outil d'analyse de simulation d'Excel pour que la différence entre les points expérimentaux et les points théoriques soit minimale. La figure 74 présente les résultats obtenus en présence d'EGCG et du dimère B3. Les résultats pour chaque procyanidine sont rassemblés dans le tableau 14.

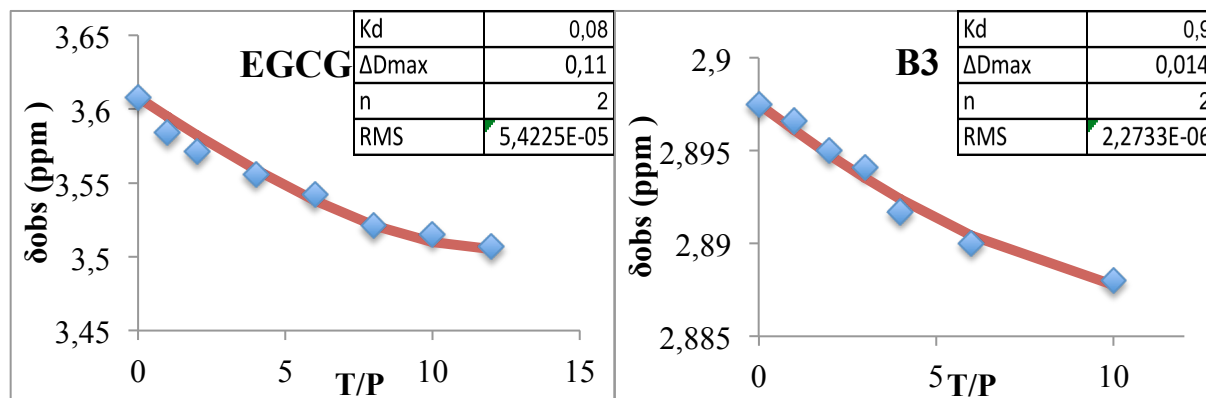


Figure 74 : Variation des déplacements chimiques du  $H_\delta$  d'une proline d'IB9-61 lors d'une titration en EGCG (gauche) ou du  $H_\beta$  de l'aspartate 55 en B3 (droite) en fonction du rapport tanins/protéine (T/P). Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation [III-C1<sub>3</sub>] permet d'accéder au  $K_d$  et au nombre de sites de fixation (paramètres dans l'encart) La valeur de  $K_d$  est donnée à  $\pm 5\%$ .

	EGCG	B3
<b>Kd (mM)</b>	0,08	0,9
<b><math>\Delta\delta_{\max}</math></b>	0,11	0,014
<b>n</b>	2	2
<b>RMS</b>	0,00005	0,000002

Tableau 14 : Valeur des constantes de dissociation  $K_d$  et du nombre de sites de fixations de l'EGCG et du dimère B3 sur la protéine IB9-61. Les valeur de  $K_d$  sont données à  $\pm 5\%$

### b. Détermination des sites de fixation du tanin

L'analyse de l'interaction entre la protéine complète et l'EGCG a également pu être suivie par des expériences RMN de type STD [173]. Cette technique permet d'observer uniquement les tanins complexés à la protéine, et de déterminer les zones du tanin impliquées dans l'interaction avec la protéine. En effet, seuls les protons du tanin proche du site d'interaction avec la protéine subiront une modification au niveau de l'intensité de leurs signaux.

Les spectres de STD obtenus (Figure 75) font apparaître une augmentation du signal des protons 2''6'', 2'6' de l'EGCG (respectivement à 6,85 et 6,47 ppm) au cours de l'expérience de titration. Cette augmentation met en évidence l'implication de ces protons de l'EGCG dans l'interaction avec la protéine IB9-61, c'est à dire localisés au niveau des cycles aromatiques.

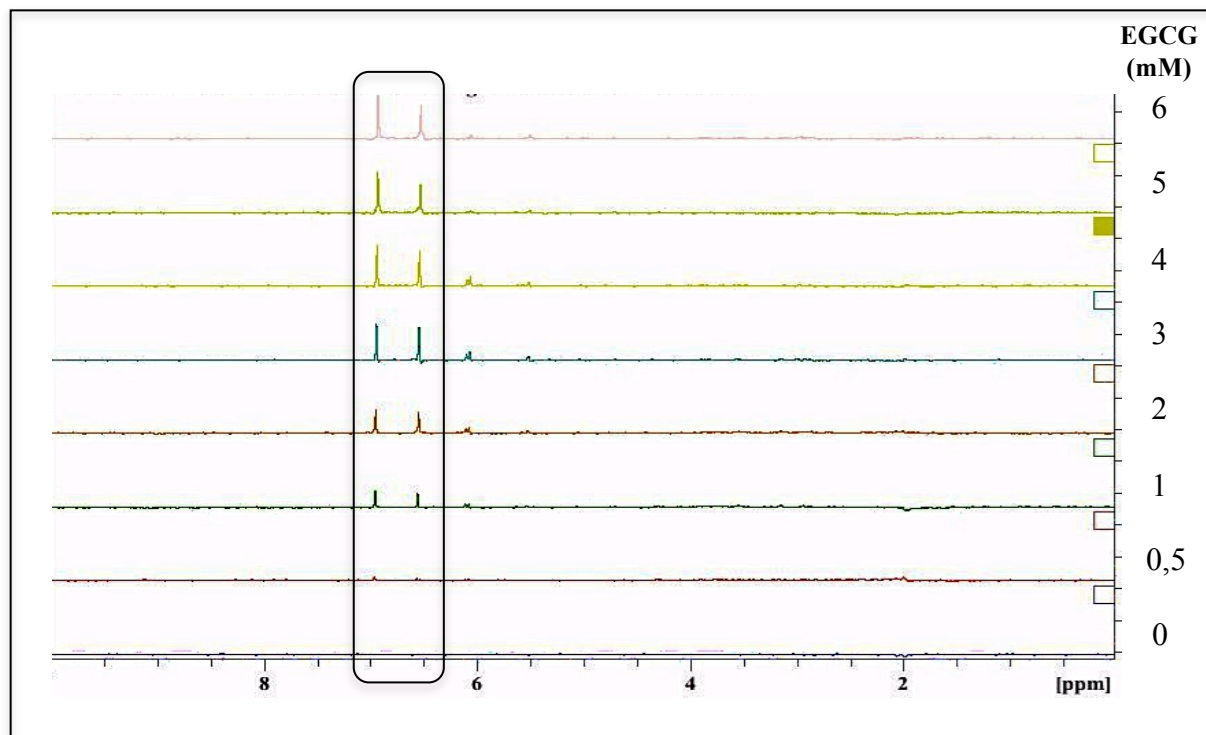


Figure 75 : Spectre STD lors d'une titration en EGCG entre 0 et 6 mM en présence de 0,5 mM en protéine IB9-61. Les signaux encadrés correspondent aux signaux des protons 2''6'' et 2'6' de l'EGCG qui se lient à la protéine.

D'autre part, l'intégration des signaux du tanin lié, au cours de la titration a été réalisée en prenant pour référence à 100% le dernier point de la titration (6 mM en EGCG). L'évolution observée de la quantité de tanins fixés en fonction du rapport tanins/protéine (Figure 76) est typique d'une courbe de saturation de la protéine par le tanin, comme le montre la présence d'un plateau au dessus d'un rapport tanins/protéines de 3.



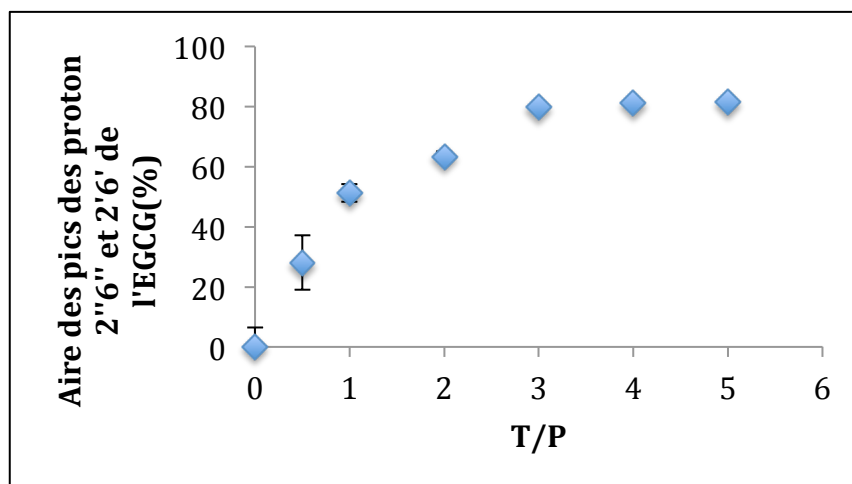


Figure 76 : Evolution de la quantité d'EGCG fixée à la protéine complète lors d'une titration en tanin entre 0 et 6 mM en présence de 0,5 mM de protéine IB9-61. Les points expérimentaux représentent une moyenne entre les intégrales des signaux des protons 2''6'' et 2'6' de l'EGCG.

L'évolution de la quantité de tanins liés à la protéine peut également être modélisée à l'aide d'une équation semblable à l'équation IV-D1 permettant cette fois-ci de modéliser l'évolution du ligand fixé et non pas du ligand libre et de tenir compte du nombre de sites de fixation :

$$TB = \frac{TB_{\max}}{2} * \left(1 + \frac{Kd}{P/n} + \frac{T/P}{n}\right) - \left\{ \left( \left(1 + \frac{T}{s_0} + \frac{Kd}{P/n} + \frac{T/P}{n}\right)^2 \right) - \left( \frac{4}{n} * \frac{T}{P} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad [V-C2]$$

Avec  $T_B$  la quantité de tanin complexé à la protéine (en %) ;  $T_{B\max}$  la quantité de tanin maximale fixée à la protéine (en %) ;  $T$  la concentration en tanin (M) ;  $P$  la concentration en protéine (M) ;  $n$  le nombre de sites de fixation du tanin sur la protéine et  $Kd$  la constante de dissociation tanins protéine (M).

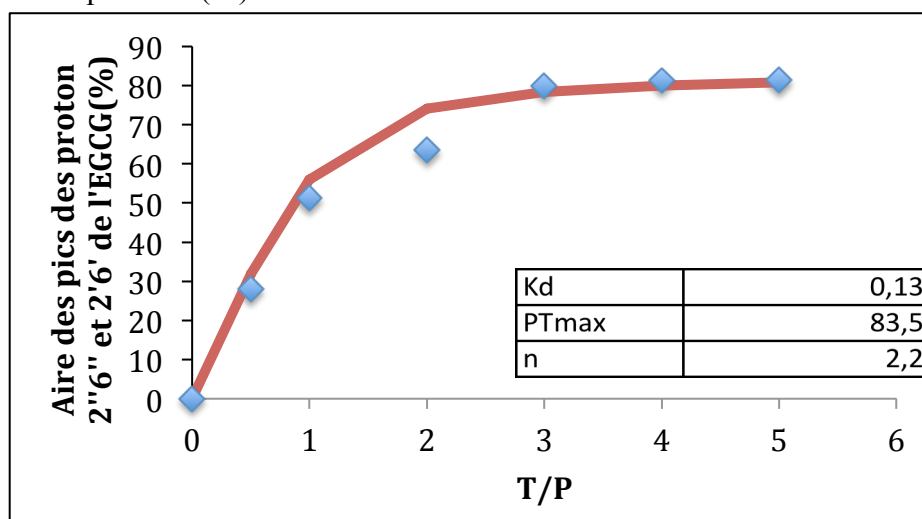


Figure 77 : Variation de la quantité d'EGCG liée à la protéine en fonction du ratio Tanins/Protéine. Les symboles représentent les points expérimentaux et la courbe paramétrée à partir de l'équation [V-C2] permet d'accéder au  $Kd$  et au nombre de sites de fixation (paramètres dans l'encart) La valeur de  $Kd$  est donnée à  $\pm 15\%$ .



Les paramètres obtenus par cette modélisation (Figure 77) sont en accord avec ceux obtenus à partir des analyses de déplacements chimiques avec un  $K_d$  de l'ordre de 0,12 mM et un nombre de sites de fixation de 2.

### 3. Bilan sur l'interaction tanins protéine complète

L'analyse de l'interaction de ces deux procyanidines (EGCG et B3) sur la protéine complète IB9-61 à partir d'analyses de déplacement chimiques et de données de STD a permis de mettre évidence un impact de la longueur de la chaîne peptidique sur l'affinité vis à vis des tanins. En effet, ces résultats sont en accord avec l'étude préalable réalisée par Cala *et al.* en 2012 qui avaient mis en évidence une fixation de 2 molécules de tanins sur un peptide IB9-37 de 37 acides aminés [65]. Cette fixation de seulement 2 molécules de tanins contre 3 pour le peptide IB9-14 avait été présentée comme liée à un facteur de repliement du peptide IB9-37 sur lui même lors de la fixation des tanins, entraînant une plus grande affinité que celle observée pour le peptide IB9-14.

Dans notre cas, avec une protéine complète de 61 acides aminés, il en est vraisemblablement de même, seulement 2 molécules de tanins sont fixées comme pour le peptide IB9-37 confortant cette hypothèse de repliement de la protéine sur elle même. Ce changement conformationnel sous l'effet de l'interaction des molécules de tanins est en accord avec une étude récente de Canon *et al* [114] qui ont montré, par une technique de spectrométrie de masse couplée à la mobilité des ions, que la PRP IB5 peut passer d'une structure étendue à une structure repliée et plus compacte, sous l'effet de l'interaction avec l'EGCG.

De plus, l'affinité pour l'interaction avec la protéine IB9 complète est plus forte que pour les peptides plus courts IB9-37 et IB9-14, traduisant probablement un repliement encore plus important de la protéine comparé au peptide de 37 acides aminés rendant la dissociation des tanins plus difficiles. Une échelle d'affinité du dimère B3 en fonction des trois longueurs de chaîne a ainsi pu être proposée (Figure 78). Un facteur d'environ 10 est observé pour chaque répétition supplémentaire de la séquence de 14 acides aminés initiale.

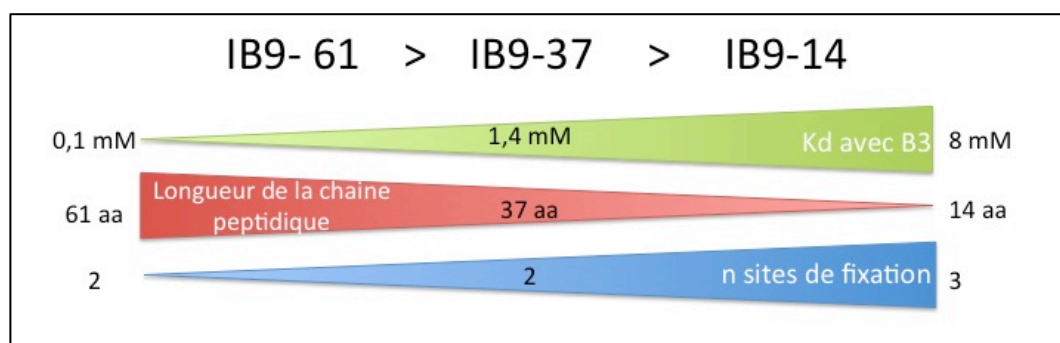


Figure 78 : Effet de la longueur de la chaîne peptidique de la PRP IB9 sur les interactions avec le dimère B3. En vert est représentée la constante de dissociation entre les différents peptides et le dimère B3, en rouge la longueur de la chaîne peptidique et en bleu le nombre de sites de fixation au niveau de chaque peptide.

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence et de confirmer une importance de la longueur de la chaîne peptidique dans les affinités vis à vis des tanins. Plus la chaîne est longue, plus l'affinité de l'interaction sera forte. Cette observation est en accord avec des travaux antérieurs qui mettent en évidence une influence de la taille de la protéine utilisée sur l'affinité [102]. En effet, Charlton *et al* montrent que le nombre de répétitions dans la séquence peptidique a une forte influence sur l'affinité, d'un facteur 100 à 1000 suivant le tanin testé. Cependant, ces travaux ne tenaient pas compte du nombre de sites de fixation et l'analyse des variations de déplacement chimique a été faite en regroupant les résidus similaires et non en traitant les résidus un à un. En revanche, en 2002 [107] dans un nouvel article, la même équipe proposait de traiter leurs résultats expérimentaux avec une nouvelle équation qui tient compte cette fois-ci du nombre de sites de fixation indépendants et présentant la même constante de dissociation Kd. Leurs résultats suggèrent alors une meilleure affinité, 40 fois plus forte pour le peptide comportant 19 résidus, comparé à celui possédant 7 résidus. Dans le cas de l'EGCG, ils ont en effet mesuré une constante de dissociation de 360 mM ( $\pm 180$ ) pour le 7-mère contre 7,8 mM ( $\pm 3,8$ ) pour le 19-mère. Au niveau du nombre de sites de fixation, les auteurs trouvent un nombre plus important pour la séquence la plus grande avec 8 sites de fixation contre 1 pour le petit peptide, alors que dans des conditions d'étude similaire entre les 3 peptides IB9 (14, 37 et 61), nous trouvons un nombre plus faible de sites de fixation de l'EGCG passant de 3 sites pour le 14-mère à 2 pour le 37-mère et le 61-mère. Cette différence peut être expliquée par le fait que les analyses réalisées par Charlton *et al* entre un peptide de 7 acides aminés et un autre de 19 résidus ne sont pas équivalentes en termes de pH et de température. En revanche notre étude confirme bien l'influence de la longueur de la chaîne peptidique des PRP dans les affinités vis à vis des tanins.



# **CHAPITRE VI :**

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## A- Conclusion générale

Le but de ce travail était d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la sensation d'astringence, principalement par l'étude de l'impact de la présence de sucres dans le vin rouge de Bordeaux sur les interactions tanins-protéines.

En effet, la sensation d'astringence est une sensation de sécheresse ressentie en bouche lors de la dégustation de vin rouge lié à une interaction entre les protéines salivaires et les tanins du vin aboutissant à un phénomène de précipitation et à la perte de la fonction de lubrification des protéines de la salive. Selon les œnologues [181], cette sensation est à nuancer : elle peut correspondre à un sentiment de dessèchement, poussiéreux ou granuleux lorsque la sensation est trop forte, ou bien à une sensation de douceur ou de velours, en présence d'un bon équilibre tannique. De plus, la description de la sensation d'astringence reste difficile car elle peut être facilement confondue avec l'amertume [13, 22].

Les tanins responsables de l'astringence sont reconnus comme étant essentiellement les tanins condensés tels que les procyanidines. Il en existe une multitude de molécules de structure très proche, composée de monomères de catéchine ou d'épicatéchine dont la seule différence repose sur la stéréochimie du carbone en position 3 [182]. Ces monomères peuvent se combiner par deux types de liaisons (C4-C8 ou C6-C8) permettant de former 8 dimères différents et 32 trimères différents. Ces molécules possèdent la capacité de s'auto-associer sous forme de micelles [87]. Cette propriété a déjà été étudiée, pour de nombreux tanins condensés, et présente des effets non négligeables sur l'interaction avec les protéines salivaires comme dans le cas de l'astringence. En effet deux phénomènes ont été mis en évidence en fonction de la concentration en tanins, avec des interactions spécifiques dans le cas de concentrations inférieures à la CMC et des interactions non spécifiques dans le cas de concentrations supérieures à la CMC [65] (Figure 79). Les sensations d'astringence plaisantes étant observées pour des concentrations inférieures à la CMC du tanin étudié.

L'interaction entre différentes procyanidines monomères, dimères et trimères et différentes protéines salivaires a été fortement étudiée depuis une vingtaine d'années aboutissant à la proposition de différents modèles d'interactions [97, 107, 122, 124] présentant des analogies et des différences. Le modèle le plus récent étant celui présenté ci-dessous.

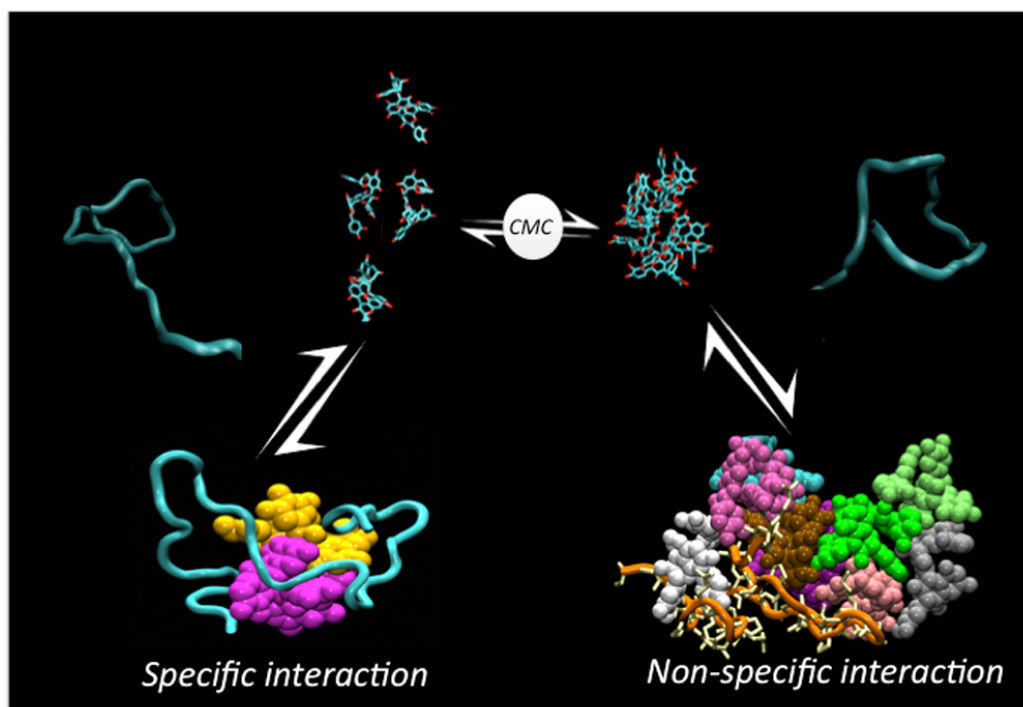


Figure 79 : Modèle d'interaction entre protéines salivaires et tanins proposé par O. Cala et al. qui dépend de l'état colloïdal du tanin. Au-dessous de la CMC, des interactions spécifiques ont lieu produisant un changement conformationnel de la protéine, qui entoure le tanin. Au-dessus de la CMC, des interactions non spécifiques dominent, provoquant la précipitation complexe. D'après Cala et al. 2012 [65].

Selon ces nombreux modèles, une importance commune de la structure tridimensionnelle des protéines et des tanins est mise en avant. Le degré de polymérisation des tanins joue également un rôle important sur l'affinité des interactions avec une évolution croissante en rapport avec le degré de polymérisation [64].

D'autre part, l'étude de l'impact de différents sucres sur les interactions tanins protéines a été étudié par différentes équipes, principalement par Mateus *et al* qui ont montré l'impact de polysaccharides utilisés en œnologie comme la pectine ou la gomme arabique, qui limite la formation de complexes tanins-protéines.[145, 146] Ces analyses leur ont permis de proposer un modèle à deux types d'interactions, avec d'un côté une formation d'un complexe tertiaire entre sucres et complexes tanins-protéines préformés, et d'un autre côté une dissociation du complexe tanins-protéines par compétition du sucre avec la protéine pour la fixation du tanin.

Dans ce travail, nous avons, dans un premier temps, montré que les sucres, simples comme le glucose et le glycérol ou polysaccharides comme la gomme arabique et la pectine présentaient la particularité de s'associer aux tanins de type catéchique, et en particulier à l'EGCG. Cette reconnaissance moléculaire s'opère avec des affinités de l'ordre de 1 à 300 mM pour les sucres étudiés et semble dépendre du poids moléculaire du sucre considéré. Cette interaction est observable à la fois au dessous et au dessus de la concentration micellaire critique de l'EGCG et ne semble pas modifier la propriété et les affinités d'auto-association du tanin en solution. En revanche cette association tanins-sucres conduit à la formation de colloïdes d'une taille qui a été estimée à environ 40 nm de diamètre dans le cas d'une interaction entre l'EGCG et la gomme arabique. La présence de ces colloïdes implique une disparition du signal en RMN des liquides des deux composés en interaction sans causer de trouble dans la solution.

Dans un second temps, l'étude de l'impact de ces mêmes sucres sur l'interaction entre l'EGCG et le peptide salivaire IB9-14 (représentatif d'un motif répété d'une manière ubiquitaire dans toutes les PRP) n'a montré aucune modification ni de l'association de l'EGCG avec le peptide, ni de l'interaction entre EGCG et polysaccharides. En effet, les constantes de dissociation observées entre EGCG et sucres (de 20 à 315 mM) sont très différentes de celles entre le peptide IB9-14 et l'EGCG qui est de 1 mM, mettant en évidence que la concentration de tanin susceptible d'interagir avec le peptide n'est quasiment pas modifiée, justifiant ainsi la stabilité de la constante d'interaction EGCG-peptide.

Ces résultats sont en adéquation avec ceux observés par Soares *et al* pour la gomme arabique avec l'observation d'interactions entre polyphénols et sucres [145, 146]. En revanche, dans les conditions expérimentales utilisées, nous n'avons pas mis en évidence de dissociation du complexe tanins-peptides comme le montre Soares *et al* dans le cas de complexes entre protéines salivaires et procyanidines de grappe de raisin. Il faut tout de même noter qu'ayant travaillé dans les concentrations typiques des vins rouges de Bordeaux, la concentration maximale en gomme arabique testée était de 0,6 g/L contre plusieurs dizaines de g/L dans le cas de l'étude de Soares *et al*. Ainsi, une forte augmentation de la concentration en gomme arabique pourrait possiblement déplacer l'équilibre et engendrer le phénomène de dissociation.

L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer un modèle dans lequel le tanin est au centre de l'interaction et peut interagir soit avec la protéine soit avec le sucre. Cet équilibre pouvant être modifié en fonction de l'affinité que présente le tanin pour le sucre (Figure 69).

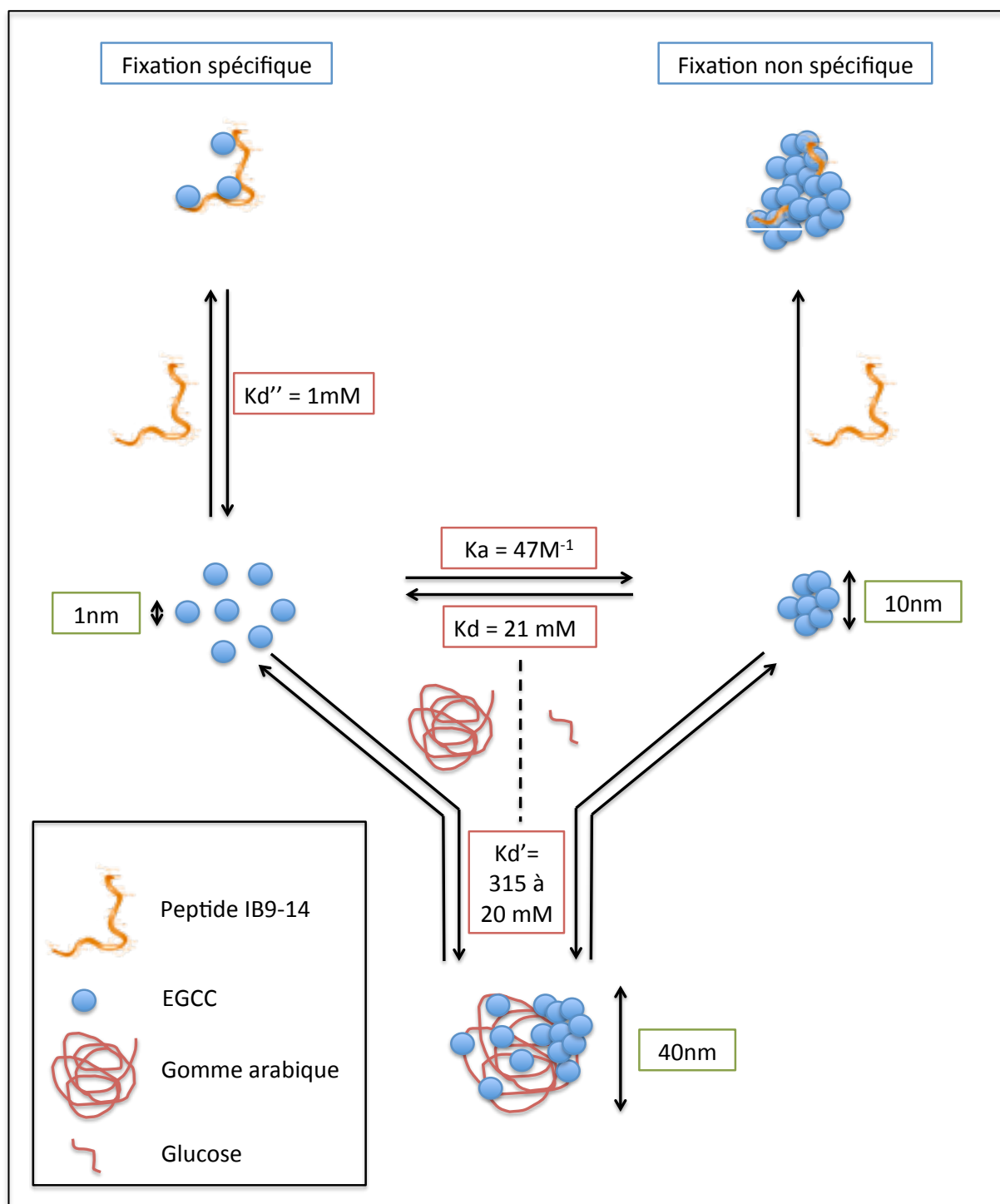


Figure 69 : Nouveau schéma d'auto-association de l'EGCG en présence de sucres. L'affinité entre le peptide salivaire IB9-14 et l'EGCG étant plus forte que l'affinité EGCG-sucre, l'interaction tanins peptide n'est pas affectée par la présence de sucre. Le sucre peut quand à lui interagir avec les tanins libres en solution et cela avec la même affinité en dessous et au dessus de la CMC de l'EGCG.



Une fois ce nouveau modèle tenant compte de l'effet des sucres mis en évidence, un travail sur la protéine IB9 entière a été réalisé. L'étude de la fixation de deux tanins, monère (EGCG) et dimère (B3), sur la protéine IB9-61 nous a permis de mettre en évidence une fixation de seulement 2 molécules de tanins par protéine contre 3 dans le cas du peptide IB9-14. De plus, les affinités observées avec la protéine complète sont plus importantes qu'avec le peptide, mettant en évidence une interaction plus forte. Ces observations sont en parfait accord avec les observations réalisées par Cala *et al* sur un peptide intermédiaire de 37 acides aminés qui ne fixe également plus que 2 molécules de tanins [65]. L'affinité est quant à elle liée à la longueur de la chaîne peptidique avec une augmentation croissante avec la taille du peptide ( $IB9-14 < IB9-37 < IB9-61$ ). Ce phénomène ayant été mis en évidence comme étant lié à un repliement du peptide IB9-37 lors de la fixation des deux molécules de tanins, il doit en être vraisemblablement de même pour la protéine complète. L'affinité croissante pouvant s'expliquer par la mise en place de nouvelles liaisons stabilisantes de type liaisons hydrogène entre les prolines et les cycles des tanins. La probabilité de former ces liaisons étant plus grande pour la protéine complète contenant 26 prolines contre 16 et 6 pour IB9-37 et IB9-14.

De façon générale, nous avons au cours de cette étude mis en place un nouveau modèle d'interactions des sucres avec les complexes tanins protéines par analyse d'un peptide modèle IB9-14 et l'analyse de la protéine IB9 entière a permis de confirmer un rôle important de la longueur de la chaîne peptidique dans les interactions avec les tanins.

## B- Perspectives :

En perspective à ce travail, un calcul de la structure de la protéine complète IB9 par RMN (les spectres ont déjà été réalisés sur un aimant 900MHz à Gif sur Yvette dans le cadre d'un projet TGIR) et par dichroïsme circulaire présenterait une première étape.

De plus, des mesures de Kd entre la protéine entière et l'EGCG devrait être réalisée en présence des différents sucres pour mesurer directement l'effet des sucres sur cette interaction en se rapprochant au plus près des conditions naturelles.

L'effet de sucres de structures différentes de ceux que nous avons étudiés et que l'on peut retrouver dans le vin pourrait également être intéressant. En effet en dehors des sucres simples, les polysaccharides étudiés sont composés d'arabinose, de galactose, de rhamnose et d'acide galacturonique. Il pourrait donc être judicieux dans une prochaine étude d'analyser l'effet de ces différents composés à la fois sur l'auto-association de l'EGCG et sur les interactions tanins-protéine entière.

En parallèle de ces mesures d'affinité, des analyses par DLS de la taille des complexes formés pourrait renseigner sur le repliement de la protéine. En effet si le repliement est bien plus important dans le cas de la protéine complète, des rayons hydrodynamiques plus faibles que ceux observés avec le peptide de 37 acides aminés devrait être mesurés.

L'étude d'autres protéines, comme les protéines riches en prolines acides, pourrait être un plus afin de les comparer aux protéines riches en prolines basiques. Il en est de même pour les tanins, l'étude d'autres procyanidines de degré de polymérisation plus élevé (trimère et plus) permettrait d'obtenir des informations sur différents modèles afin de voir si une généralisation est possible.

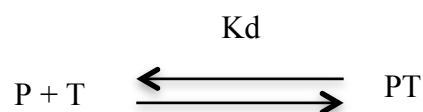
Au niveau technologique, la RMN reste une technique de choix pour l'ensemble de ces études, mais il serait complémentaire de comparer les interactions à l'aide de la modélisation moléculaire qui permet de réaliser des calculs sur des systèmes de plus en plus complexes pour des simulations longues en un temps convenable.

Enfin du point de vue de l'astringence, les tanins et les sucres jouant un rôle dans les mécanismes d'interactions entre protéines salivaires et tanins, il serait intéressant de tester leur impact lors de test de dégustation. Pour cela il faudrait choisir un panel de dégustateurs et leur faire déguster un vin avec différents ajouts dosés de tanins synthétiques et/ou de sucres. Le problème se posant étant d'obtenir d'assez grandes quantités de procyanidines pures pour réaliser ces dégustations sur un panel conséquent à valeur de statistique.



## **ANNEXES :**

## Annexe 1 : Démonstration de l'équation [III-C1<sub>3</sub>]



Avec  $Kd = [P][T] / [PT]$

Et  $[P] = [P_0] - [PT]$

$$[T] = [T_i] - [PT]$$

Et si cet équilibre est dit « rapide » à l'échelle de temps de la RMN, 1 seul déplacement chimique sera observé,  $\delta_{obs}$ , qui correspondra à une pondération entre le peptide seul et le peptide associé à un tanin :

$$\delta_{obs} = \left( \frac{[P]}{[P_0]} \right) \delta_P + \left( \frac{[PT]}{[P_0]} \right) \delta_{PT}$$

Avec  $\Delta\delta_{max} = \delta_P - \delta_{PT}$

On peut écrire la variation de déplacement chimique donné  $\Delta\delta$  à une concentration de T et de P de la façon suivante :

$$\Delta\delta = \delta_P - \delta_{obs}$$

Soit

$$\Delta\delta = \delta_P - \left( \frac{[P]}{[P_0]} \right) \delta_P - \left( \frac{[PT]}{[P_0]} \right) \delta_{PT}$$

$$\Delta\delta = \left( [P_0] - \left( \frac{[P]}{[P_0]} \right) \right) \delta_P - \left( \frac{[PT]}{[P_0]} \right) \delta_{PT}$$

$$\Delta\delta = \left( \frac{[PT]}{[P_0]} \right) \delta_P - \left( \frac{[PT]}{[P_0]} \right) \delta_{PT}$$

Et donc :  $\Delta\delta = \left( \frac{[PT]}{[P_0]} \right) \Delta\delta_{max}$  [A1<sub>1</sub>]

De l'ensemble de ces équations, on peut écrire la relation suivante :

$$Kd = ([P_0] - [PT]) ([T_i] - [PT]) / [PT]$$

soit :

$$[PT]^2 - [PT]([T_i] + [P_0] + Kd) + [P_0][T_i] = 0$$

et donc :

$$\frac{[PT]}{[P_0]} = \frac{1}{2} \left( 1 + \frac{[T_i]}{[P_0]} + \frac{Kd}{[P_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{[T_i]}{[P_0]} + \frac{Kd}{[P_0]} \right)^2 - \frac{4[T_i]}{[P_0]} \right\}^{1/2}$$

et donc, si on intègre cette dernière équation dans l'équation (A1), on obtient

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{max} \left( \left( 1 + \frac{[T_i]}{[P_0]} + \frac{Kd}{[P_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{[T_i]}{[P_0]} + \frac{Kd}{[P_0]} \right)^2 - \frac{4[T_i]}{[P_0]} \right\}^{1/2} \right) \quad [A1_2]$$

Cette équation peut être étendue à la fixation indépendante de n tanins sur la protéine à condition que chaque site de fixation ait la même affinité pour le tanin et s'écrit donc :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{max} \left( \left( 1 + \frac{[T_i]}{n[P_0]} + \frac{Kd}{n[P_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{[T_i]}{n[P_0]} + \frac{Kd}{n[P_0]} \right)^2 - \frac{4[T_i]}{n[P_0]} \right\}^{1/2} \right) \quad [A1_3]$$

où n représente le nombre de tanins fixés par protéine, [P0] la concentration totale de protéine et [Ti] la quantité de tanins disponibles compte tenu de leur capacité à s'auto-associer :

$$[T_i] = [T]/(1 - Ka[T])$$

Et 
$$[T] = \left\{ (1 + 2Ka[T_0]) + (1 + 4Ka[T_0])^{\frac{1}{2}} \right\} / 2Ka^2[T_0]$$

où [T0] représente la concentration totale en tanin et Ka la constante d'association. Ainsi, les variations de déplacements chimiques du peptide peuvent être analysées avec l'équation II- 10, en ajustant les variables Kd et n. Il est également à noter que les variations de coefficient de diffusion observées pour le peptide lorsque l'on rajoute des tanins suivent la même équation, et dans ce cas  $\Delta\delta$  peut être remplacé par  $\Delta D$ .

## Annexe 2 : Démonstration de l'équation [IV-D1]



Avec

$$Kd = [S_L][T] / [ST]$$

Et

$$[S_L] = [S_0] - [ST] \quad [A2_1]$$

$$[T] = [T_0] - [ST]$$

donc

$$Kd = (([S_0] - [ST]) \times ([T] - [ST])) / [ST]$$

soit :

$$[ST]^2 - [ST]([T] + [S_0] + Kd) + [S_0][T] = 0$$

donc

$$\frac{[ST]}{[S_0]} = \frac{1}{2} \left( 1 + \frac{[T]}{[S_0]} + \frac{Kd}{[S_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{[T]}{[S_0]} + \frac{Kd}{[S_0]} \right)^2 - \frac{4[T]}{[S_0]} \right\}^{1/2}$$

ainsi :

$$[ST] = \frac{S_0}{2} \left( 1 + \frac{[T]}{[S_0]} + \frac{Kd}{[S_0]} \right) - \left\{ \left( 1 + \frac{[T]}{[S_0]} + \frac{Kd}{[S_0]} \right)^2 - \frac{4[T]}{[S_0]} \right\}^{1/2}$$

Et si on intègre l'équation [A2<sub>1</sub>] dans [A2<sub>2</sub>], on obtient :

$$S_L = -\frac{S_0}{2} \times \left( \left( 1 + \frac{T}{S_0} + \frac{Kd}{S_0} \right) - \left( \left( 1 + \frac{T}{S_0} + \frac{Kd}{S_0} \right)^2 - 4 \times \frac{T}{S_0} \right)^{\frac{1}{2}} \right) + S_0 \quad [A2_3]$$

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :**



1. Taillandier, P., *Le vin : composition et transformations chimique*. 2005.
2. Blouin, J., *Analyse et composition des vins, comprendre le vin*. 2008.
3. Hagerman, A.E. and L.G. Butler, *The specificity of proanthocyanidin-protein interactions*. J. Biol. Chem., 1981. **256**(4494-4497).
4. McManus, J.P., et al., *Polyphenol interactions. Part 1. Introduction: some observations on the reversible complexation of the polyphenols and polysaccharides*. J. Chem. Soc. Perkins Trans. II, 1985: p. 1429-1443.
5. Spencer, C.M., et al., *Polyphenol complexation—some thoughts and observations*. Phytochemistry, 1988. **27**(8): p. 2397-2409.
6. Ribereau-gayon, P., *Traité d'oenologie, tome 2, Chimie du vin, stabilisation et traitement*. 1998.
7. Bate-Smith, E.C., *Astringency in foods*. Foods, 1954. **23**: p. 124.
8. Joslyn, M.A. and J.L. Goldstein, *Astringency of fruit and fruit products in relation to phenolic content*. New York Academic Press ed, ed. A.i.f. research 1964, Chichester: M. E. Mrack G.F. Stewart. 179-217.
9. Green, B.G., *Oral astringency: a tactile component of flavor*. Acta Psychology Amsterdam, 1993: p. 84-119.
10. Bacon, J.R. and M.J.C. Rhodes, *Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it*. J. Agric. Food Chem., 2000. **48**(3): p. 838-843.
11. Breslin, P.A.S., et al., *Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation*. Chem. Senses, 1993. **18**: p. 405-417.
12. Critchley, H.D. and E.T. Rolls, *Responses of primate taste cortex neurons to the astringent tastant tannic acid*. Chemical senses, 1996. **21**(2): p. 135-45.
13. Lee, C.B. and H.T. Lawless, *Time-course of astringent sensations*. Chemical senses, 1991. **16**: p. 225-238.
14. Lawless, H.T., C.J. Corrigan, and C.B. Lee, *Interactions of astringent substances*. Chemical senses, 1994. **19**(2): p. 141-54.
15. Haslam, E., T.H. Lilley, and L.G. Butler, *Natural astringency in foodstuffs — A molecular interpretation*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1988. **27**(1): p. 1-40.
16. Bate-Smith, E.C., *Haemanalysis of tannins - the concept of relative astringency*. Phytochemistry, 1973. **12**: p. 907-912.
17. Singleton, V.L. and P. Esau, *Phenolic substances in grapes and wine, and their significance*. Advances in food research. Supplement, 1969. **1**: p. 1-261.
18. Gawel, R., P.G. Iland, and I.L. Francis, *Characterizing the astringency of red wine: a case study*. Food quality and preference, 2001. **12**: p. 83-94.
19. Gawel, R., L. Francis, and E.J. Waters, *Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines*. Journal of agricultural and food chemistry, 2007. **55**(7): p. 2683-7.

20. Fischer, U., R.B. Boulton, and A.C. Noble, *Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli* Food Quality and Preference, 1994. **5**(1-2): p. 55-64.
21. Scollary, G.R., *Astringency response of red wine : Potential role of molecular assembly*. Trends in Food Science & Technology, 2012. **27**: p. 25-36.
22. Kallithraka, S., J. Bakker, and M.N. Clifford, *Evidence that salivary proteins are involved in astringency*. Journal of Sensory Studies, 1998. **13**: p. 29-43.
23. Humphrey, S.P. and R.T. Williamson, *A review of saliva: normal composition, flow, and function*. The Journal of prosthetic dentistry, 2001. **85**(2): p. 162-9.
24. Wu, A.M., G. Csako, and A. Herp, *Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins*. Molecular and cellular biochemistry, 1994. **137**(1): p. 39-55.
25. Gho, F., A. Pena-Neira, and R.O. Lopez-Solis, *Induction of salivary polypeptides associated with parotid hypertrophy by gallotannins administered topically into the mouse mouth*. Journal of cellular biochemistry, 2007. **100**(2): p. 487-98.
26. Neyraud, E., et al., *Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes*. Journal of Proteome Research, 2006. **5**(9): p. 2474-80.
27. Walz, A., et al., *Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1631-9.
28. Guo, t., p.A. Rudnicki, and e. al., *Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with esi-tandem ms* Journal of Proteome Research, 2006. **5**(6): p. 1469-1478.
29. Bennick, A., *Salivary proline-rich proteins*. Molecular and cellular biochemistry, 1982. **45**(2): p. 83-99.
30. Levine, M.J., *Salivary Macromolecules : A Structure/Function Synopsis* Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. **694**: p. 11-16.
31. Scarano, E., et al., *Proteomics of saliva: personal experience*. Acta Otorhinolaryngol Italica, 2010. **30**(3): p. 125-130.
32. Fox, P.C., et al., *Quantitation of total human salivary mucins* Journal of Dental Research, 1985. **64**: p. 327.
33. Fox, P.C., *Simplified biopsy technique for labial minor salivary glands*. Plastic and reconstructive surgery, 1985. **75**(4): p. 592-3.
34. Iontcheva, I., F.G. Oppenheim, and R.F. Troxler, *Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins*. Journal of Dental Research, 1997. **76**(3): p. 734-43.
35. Kauffman, D.L. and P.J. Keller, *The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject*. Arch Oral Biol, 1979. **24**: p. 249-256.
36. Bennick, A., *Structural and genetic aspects of proline-rich proteins*. Journal of Dental Research, 1987. **66**: p. 457-461.
37. Bennick, A., et al., *The location and nature of calcium-binding sites in salivary acidic proline-rich phosphoproteins*. J. Biol. Chem., 1981. **256**: p. 4741-4746.

38. Kauffman, D., et al., *Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: complete covalent structure of protein IB-9 and partial structure of protein IB-6, members of a polymorphic pair*. Biochemistry, 1982. **21**(25): p. 6558-62.
39. Maeda, N., *Inheritance of the human salivary proline-rich proteins: A reinterpretation in terms of six loci forming two subfamilies*. Biochemical Genetics, 1985. **23**(5-6): p. 455-464.
40. Wong, R.S.C., et al., *Structural studies on human proline-rich salivary proteins*. Journal of Dental Research, 1980. **59**: p. 541.
41. Hay, D.I., E.C. Moreno, and D.H. Schlesinger, *phosphoprotein-inhibitors of calcium-phosphate precipitation from salivary secretions*. inorganic perspectives in biology and medicine, 1979. **2**(4): p. 271-285.
42. Moreno, E.C., K. Varughese, and D.I. Hay, *effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium-phosphate*. calcified tissue international, 1979. **28**(1): p. 7-16.
43. Hatton, M.N., et al., *Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary-albumine complex*. Biochem J, 1985. **230**: p. 817-820.
44. Bergey, E.J., et al., *Use of the photoaffinity cross-linking agent N-hydroxysuccinimidyl-4-azidocyclohexanecarboxylic acid to characterize salivary-glycoprotein-bacterial interactions*. Biochem.J., 1986. **234**(1): p. 43-48.
45. Ayad, M., et al., *The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience*. Journal of Dental Research, 2000. **79**(4): p. 976-82.
46. Beeley, J.A., *Basic proline-rich proteins: multifunctional defense molecules?* Oral Diseases, 2001. **7**: p. 69-70.
47. Mehansho, H., et al., *Induction of proline-rich proteins in hamster salivary glands by isoproterenol treatment and an unusual growth inhibition by tannins*. The Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(25): p. 12344-12350.
48. McArthur, C., G.D. Sanson, and A.M. Beal, *Salivary proline-rich proteins in mammals: Roles in oral homeostasis and counteracting dietary tannin*. Journal of Chemical Ecology, 1995. **21**: p. 663-691.
49. Carlson, D.M., *proline-rich proteins and glycoproteins - expressions of salivary-gland multigene families*. biochimie, 1988. **70**(11): p. 1689-1695.
50. Lu, Y. and A. Bennick, *Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins*. Arch. Oral Biochem., 1998. **43**: p. 717-728.
51. Mehansho, H., A. Hagerman, and e. al, *modulation of proline-rich protein-biosynthesis in rat parotid-glands by sorghums with high tannin levels*. proceedings of the national academy of sciences of the united states of america-biological sciences, 1983. **80**(13): p. 3948-3952.
52. Warner, T.F. and E.A. Azen, *Tannins, salivary proline-rich proteins and oesophageal cancer*. Medical Hypotheses, 1988. **26**: p. 99-102.
53. Lyons, K.M., et al., *Many protein products from a few loci: assignment of human salivary proline-rich proteins to specific loci*. Genetics, 1988. **120**(1): p. 255-65.

54. Lyons, K.M., J.H. Stein, and O. Smithies, *Length polymorphisms in human proline-rich protein genes generated by intragenic unequal crossing over*. Genetics, 1988. **120**(1): p. 267-78.
55. Scherer, S.E., et al., *The finished DNA sequence of human chromosome 12*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 346-51.
56. Stubbs, M.J., et al., *Encoding of human basic and glycosylated proline-rich proteins by the PRB gene complex and proteolytic processing of their precursor proteins*. Arch. Oral Biol., 1998. **43**: p. 753-770.
57. Saitoh, E., S. Isemura, and K. Sanada, *Complete amino acid sequence of a basic proline-rich peptide, P-F, from human parotid saliva*. Journal of biochemistry, 1983. **93**(3): p. 883-8.
58. Saitoh, E., S. Isemura, and K. Sanada, *Further fractionation of basic proline-rich peptides from human parotid saliva and complete amino acid sequence of basic proline-rich peptide P-H*. Journal of biochemistry, 1983. **94**(6): p. 1991-9.
59. Simon, C., I. Pianet, and E.J. Dufourc, *Synthesis and CD study of the human salivary Proline-Rich Protein: IB7*. J. Pept. Sci., 2002. **9**: p. 125-131.
60. Williamson, M.P., *Nuclear magnetic resonance studies of peptides and their interactions with receptors*. Biochemical Society transactions, 1994. **22**(1): p. 140-4.
61. Hagerman, A.E. and L.G. Butler, *Determination of protein in tannin-protein precipitates*. Journal of agricultural and food chemistry, 1980. **28**(5): p. 944-7.
62. Kauffman, D.L., et al., *Basic proline-rich proteins from parotid saliva: relationships of the covalent structures of ten proteins from a single individual*. Biochemistry, 1991. **30**(14): p. 3351-3356.
63. Isemura, S., E. Saitoh, and K. Sanada, *Fractionation and characterization of basic proline-rich peptides of human parotid saliva and the amino acid sequence of proline-rich peptide P-E*. Journal of biochemistry, 1982. **91**(6): p. 2067-2075.
64. Cala, O., et al., *NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins : revisiting astringency from molecular and colloidal prospects*. Faseb J, 2010. **24**(11): p. 4281-4290.
65. Cala, O., et al., *The colloidal state of tannins impacts the nature of their interaction with proteins: the case of salivary proline-rich protein/procyanidins binding*. Langmuir, 2012. **28**(50): p. 17410-17418.
66. Swain, T. and E.C. Bate-Smith, *Flavonoid compounds.*, in *Comparative Biochemistry*, M.F.a.H.S. Mason, Editor 1962, Academic Press: London.
67. Bertuccioli, M. and S. Ferrari, *Colloids and mouthfeel in wines*. ed. Lallemand, 1999.
68. Ribereau-gayon, P., *Interpretation chimique de la couleur des vins rouges*. Vitis, 1973. **12**: p. 119-142.
69. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. **56**(11): p. 317-333.
70. Haslam, E., et al., *Traditional herbal Medicines-The role of polyphenols*. Planta Medica, 1989. **55**: p. 1-8.
71. Prieur, C., et al., *Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds*. Phytochemistry, 1994. **36**(3): p. 781-784.

72. Souquet, J.-M., et al., *Polymeric proanthocyanidins from grape skins*. Phytochemistry, 1996. **43**(2): p. 509-512.
73. Ribereau-gayon, P., *Annales de physiologie végétale*, 1964. **6**: p. 211-242.
74. Ribereau-gayon, P., *untitled*. journal international des sciences de la vigne et du vin, 2002. **36**(1): p. 1.
75. Haslam, E., *Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense-A reappraisal*. Journal of Chemical Ecology, 1988. **14**(10): p. 1789-805.
76. Foo, L.Y. and L.J. Porter, *the phytochemistry of proanthocyanidin polymers*. phytochemistry, 1980. **19**(8): p. 1747-1754.
77. De Freitas, V.A.P., et al., *Characterization of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion Mass Spectrometry*. Phytochemistry, 1998. **49**(5): p. 1435-11441.
78. Foo, L.Y. and L.J. Porter, *Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. , 1983. **1**: p. 1535-1543.
79. Hatano, T. and R.W. Hemingway, *Conformational isomerism of phenolic procyanidins : preferred conformations in organic solvents and water*. J. Chem. Soc. (Perkin Trans II), 1997: p. 1035-1043.
80. Khan, M.L., E. Haslam, and M.P. Williamson, *Structure and conformation of the procyanidin B-2 dimer*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1997. **35**: p. 854-858.
81. Tarascou, I., et al., *A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling*. Magn. Reson. Chem., 2006. **44**(9): p. 868-880.
82. Tarascou, I., et al., *Structural and conformational analysis of two native procyanidin trimers*. Magn. Reson. Chem., 2007. **45**(2): p. 157-166.
83. Tarascou, I., et al., *An improved synthesis of procyanidin dimers: Regio- and stereocontrol of the interflavan bond*. Eur. J. Org. Chem., 2006(23): p. 5367-5377.
84. Furlan, A.L., et al., *Red wine tannins fluidify and precipitate lipid liposomes and bicelles. A role for lipids in wine tasting?* Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 2014. **30**(19): p. 5518-26.
85. Haslam, E., *invino veritas - oligomeric procyanidins and the aging of red wines*. phytochemistry, 1980. **19**(12): p. 2577-2582.
86. Baxter, N.J., et al., *Stacking interactions between caffeine and methyl gallate*. J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1996. **92**(2): p. 231-234.
87. Pianet, I., et al., *Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: A study by diffusion NMR and molecular mechanics*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 11027-11035.
88. He, F., et al., *Chemical synthesis of proanthocyanidins in vitro and their reactions in aging wines*. Molecules, 2008. **13**(12): p. 3007-32.
89. Aron, P.M. and J.A. Kennedy, *Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity*. Molecular nutrition & food research, 2008. **52**(1): p. 79-104.
90. Pourcel, L., et al., *Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions*. Trends in plant science, 2007. **12**(1): p. 29-36.

91. Gueroux, M., *Polyphenols and Alzheimer's Disease: Tau/polyphenol interactions investigated by NMR and molecular modelling*. Nutrition and Aging, 2012. **1**(3-4): p. 201-206.
92. Fabre, S., et al., *Colloidal behavior of wine galloylated tannins*. CR Chimie, 2010. **13**(5): p. 561-565.
93. Arts, I.C., B. van De Putte, and P.C. Hollman, *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk*. journal of agricultural and food chemistry, 2000. **48**(5): p. 1752-7.
94. Carvalho, E., et al., *Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins*. J. Agric. Food Chem., 2006. **54**(23): p. 8936-8944.
95. Frazier, R.A., et al., *Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010. **51**(2): p. 490-5.
96. Frazier, R.A., et al., *Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry*. journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(18): p. 5189-95.
97. Jöbstl, E., et al., *Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions*. Biomacromolecules, 2004. **5**: p. 942-949.
98. De Freitas, V. and N. Mateus, *nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002. **82**(1): p. 113-119.
99. Naurato, N., et al., *Interaction of tannin with human salivary histatins*. journal of agricultural and food chemistry, 1999. **47**(6): p. 2229-34.
100. Wroblewski, K. and A. Bennick, *the interaction of human salivary histatin5 with epigallocatechin gallate*. Journal of Dental Research, 2000. **79**: p. 2290.
101. Wroblewski, K., et al., *The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds*. European journal of biochemistry / FEBS, 2001. **268**(16): p. 4384-97.
102. Charlton, A.J., et al., *Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats*. FEBS Letters, 1996. **382**: p. 289-292.
103. Canon, F., et al., *Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009. **395**(8): p. 2535-45.
104. Simon, C., et al., *Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin-Saliva PProtein Complexes. A Multitechnique Approach*. Biochemistry, 2003. **42**: p. 10385-10395.
105. Baxter, N.J., et al., *Multiple interaction between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation*. Biochemistry, 1997. **36**: p. 5566-5577.
106. Luck, G., *Polyphenol astringency and proline-rich proteins*. Phytochemistry, 1994. **37**: p. 357-371.
107. Charlton, A.J., et al., *Polyphenol/peptide Binding Precipitation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**: p. 1593-1601.

108. Hagerman, A.E., M.E. Rice, and N.T. Ritchard, *Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloylglucose and epicatechin<sub>16</sub> (4-8) catechin (procyanidin)*. J. Agric. Food Chem., 1998. **46**: p. 2590-2595.
109. Ozawa, T., T.H. Lilley, and E. Haslam, *Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit*. . Phytochemistry, 1987. **26**: p. 2937-2942.
110. De Freitas, V., E. Carvalho, and E. al., *study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry*. Food Chemistry, 2003. **81**(4): p. 503-509.
111. Carvalho, E., N. Mateus, and E. al., *flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**(1): p. 97-101.
112. Pascal, C., et al., *Study of the interactions between a Proline-Rich Protein and a Flavan-3-ol by NMR: Residual Structures in the natively unfolded Protein provides anchorage points for the ligands*. Biopolymers, 2009. **91**(9): p. 745-756.
113. Sarni-Manchado, P. and V. Cheynier, *Study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of mass spectrometry : JMS, 2002. **37**(6): p. 609-16.
114. Canon, F., et al., *Folding of a salivary Intrinsically Disordered Protein upon binding to tannins*. J. Am. Chem. Soc., 2011. **133**: p. 7847-7852.
115. Douat-Casassus, C., et al., *Specific or nonspecific protein-polyphenol interactions? Discrimination in real time by surface plasmon resonance*. Chembiochem : a European journal of chemical biology, 2009. **10**(14): p. 2321-4.
116. Nonier, M.F., et al., *Condensation products derived from flavan-3-ol oak wood aldehydes reaction - I. Structural investigation*. Anal. Chim. Acta, 2006. **563**(1-2): p. 76-83.
117. Carteau, D., et al., *Probing the initial events in the spontaneous emulsification of trans-anethole using dynamic NMR spectroscopy*. Langmuir, 2007. **23**(7): p. 3561-3565.
118. Zanchi, D., et al., *Colloidal stability of tannins : astringency, wine tasting and beyond*. journal of physics: Condensed Matter, 2008. **20** (494224): p. 6.
119. Murray, N.J., et al., *Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy*. Eur. J. Biochem., 1994. **219**(923-935).
120. Schwarz, B. and T. hofman, *is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding?* european food research and technology, 2008. **227**(6): p. 1693-1698.
121. Sarni-Manchado, P., V. Cheynier, and M. Moutounet, *Interactions of Grape seed tannins with salivary proteins*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1999. **47**: p. 42-47.
122. Haslam, E., Journal of Chemical Society, Chemical Communication 1981. **309**.
123. Hagerman, A.E., et al., *Phenolic compounds in food and their affects on health I. Analysis, occurence and chemistry*, 1992.
124. Siebert, K.J., N.V. Troukhanova, and P.Y. Lynn, *Nature of polyphenol-Protein interactions*. J. Agric. Food Chem., 1996. **44**: p. 80-85.

125. Cala, O., et al., *Towards a molecular interpretation of astringency: synthesis, 3D structure. Colloidal state and human saliva protein recognition of procyanidins.* *Planta medica*, 2011. **77**: p. 1116-1122.
126. Haslam, E., *Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs : possible modes of action.* *J. Nat . Prod.*, 1996. **59**: p. 205-215.
127. Jobstl, E., et al., *Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy.* *journal of agricultural and food chemistry*, 2006. **54**(12): p. 4077-81.
128. Clifford, M.N., *coffee bean dicaffeoylquinic acids.* *phytochemistry*, 1986. **25**(7): p. 1767-1769.
129. De Freitas, V. and N. Mateus, *Structural features of procyanidins interactions with salivary proteins.* *J Agric Food Chem*, 2001. **49**: p. 940-945.
130. Llaubères, R.M., D. Dubourdieu, and J.C. Villettaz, *Exocellular polysaccharides from Saccharomyces in wine.* *journal of the Science of Food and Agriculture*, 1987. **41**: p. 277-286.
131. Waters, E.J., P. Pellerin, and J.-M. Brillouet, *A Saccharomyces mannoprotein that protects wine from protein haze. .* *Carbohydrate Polymers*, 1994. **23**(3): p. 185-191.
132. Doco, T., et al., *Les polysaccharides pectiques de la pulpe et de la pellicule de raisin. Quel devenir pendant la phase pré-fermentaire?* *Revue Française d'Oenologie*, 1995. **153**: p. 16-23.
133. Pellerin, P., et al., *Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content.* *Carbohydrate research*, 1995. **277**(1): p. 135-43.
134. Vidal, S., et al., *Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides.* *Carbohydrate polymers*, 2001. **45**: p. 315-323.
135. Albersheim, P., et al., *An hypothesis: The same polyasaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants.* *Pectins and Pectinases* 1996(47-55).
136. Vidal, S., et al., *Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain.* *Carbohydrate research*, 2000. **326**(4): p. 277-94.
137. O'Neill, M.A., et al., *Rhamnogalacturonan-II, a Pectic Polysaccharide in the Walls of Growing Plant Cell, Forms a Dimer That Is Covalently Cross-linked by a Borate Ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. .* *The Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(37): p. 22923-22930.
138. Rodriguez-Carvajal, M.A., et al., *The three-dimensional structure of the mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: a combined molecular modeling and NMR investigation.* *Carbohydrate Research*, 2003. **338**(7): p. 651-671.
139. Pellerin, P., et al., *Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II.* *Carbohydrate research*, 1996. **290**(2): p. 183-97.
140. Ribereau-gayon, J., et al., *Sciences et techniques du vin, Tome IV.* Dunod, Paris, 1977.
141. Escot, S., et al., *Actualités oenologique 2003, VII eme Symposium international d'oenologie, Lavoisier, Tec et Doc, Paris.* 2003.



142. Riou, V., et al., *Aggregation of grape seed tannins in model wine -effect of wine polysaccharides*. Food Hydrocolloids, 2002. **16**: p. 17-23.
143. Poncet-Legrand, C., et al., *Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins : effect of polysaccharide molecular weight* American Journal of Enology and Viticulture, 2007. **58**: p. 87-89.
144. Mateus, N., et al., *Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**: p. 135-140.
145. Soares, S.I., et al., *Mechanistic Approach by Which Polysaccharides Inhibit  $\alpha$ -Amylase/Procyanidin Aggregation*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**: p. 4352-4358.
146. Soares, S., N. Mateus, and V. de Freitas, *Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins*. Journal of agricultural and food chemistry, 2012. **60**(15): p. 3966-72.
147. Gonçalves, R., et al., *Mechanisms of tannin-induced trypsin inhibition: A molecular approach*. Langmuir, 2011. **27**(21): p. 13122-13129.
148. Merrifield, R., B, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(14): p. 2149-2154.
149. Charles, L., *Maldi of synthetic polymers with labile end-groups*. Mass Spectrometric Reviews, 2013: p. DOI: 10.1002/mas.21403.
150. De Freitas, V., *Recherches sur les tanins condensés : Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin*. Thèse de doctorat en Sciences biologiques et médicales. Œnologie-ampélogie de l'université Bordeaux 2, 1995.
151. Botha, J.J., *Condensed tannins, direct synthesis, structure, and absolute configuration of four biflavanoids from Black Wattle Bark ("Mimosa") extract*. Journal of the chemical Society , chemical communications, 1978: p. 700-702.
152. Balas, L. and J. Vercauteren, *Extensive High-Resolution reverse 2D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers*. Magn. Reson. Chem., 1994. **32**: p. 386-393.
153. Wuthrich, K., *Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Science, 1989. **243**(4887): p. 45-50.
154. Nagayama, k., a. Kumar, and e. al., *experimental-techniques of two-dimensional correlated spectroscopy*. Journal of magnetic resonance, 1980. **40**(2): p. 321-334.
155. Braunschweiler, I. and r.R. Ernest, *Coherence transfert by isotropic mixing - application to proton correlation spectroscopy*. Journal of magnetic resonance, 1983. **55**(3): p. 521-528.
156. Bax, a. and d.G. Davis, *mlev-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfert spectroscopy*. Journal of magnetic resonance, 1985. **65**(2): p. 335-360.
157. Cala, O., *Approche moléculaire de l'astringence par l'étude des interactions entre les tanins du vin et les protéines de la salive*. Thèse de doctorat en Chimie-physique de l'université Bordeaux 1, 2010.

158. Noggle, J.H. and R.E. Shirmer, *The nuclear overhauser effects*. Academic Press, New York, 1971.
159. Bystrov, V.F., *Spin-Spin Coupling and the Conformational States of Peptide Systems* Program NMR Spectroscopy, 1976. **10**: p. 41–81.
160. Piantini, U., O.W. Sorensen, and R.R. Ernst, *Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks*. Journal of American Chemical Society 1982. **104** p. 6800-6801.
161. Pardi, A., M. Billeter, and K. Wüthrich, J. Mol. Biol., 1984. **180**: p. 741-751.
162. Morris, k.F. and C.S. Johnson, *resolution of discrete and continious molecular-size distributions by means of diffusion-ordered 2d nmr-spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(10): p. 4291- 4299.
163. Wu, d.H., A.D. Chen, and e. al., *an improved diffusion-ordered spetcroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses*. journal of magnetic resonance serie a, 1995. **115**(2): p. 260-264.
164. Cohen, Y., L. Avram, and e. al., *diffusion nmr spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: an old parameter - new insights*. angewandte Chemie - intenationnal edition, 2005. **44**(4): p. 520-554.
165. Ornelas, C., et al., *New water-soluble polyanionic dendrimers and binding to acetylcholine in water by means of contact ion-pairing interactions*. Chemical Communications, 2007(47): p. 5093-5095.
166. Boisselier, E., et al., *Four generations of water-soluble dendrimers with 9 to 243 benzoate tethers: Synthesis and dendritic effects on their ion pairing with acetylcholine, benzyltriethylammonium, and dopamine in water*. Chemistry-a European Journal, 2008. **14**(18): p. 5577-5587.
167. Duluard , S., J. Grondin, and e. al., *lithium solvation and diffusion in the 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ionic liquid*. journal of raman spectroscopy, 2008. **39**(5): p. 627-632.
168. Johnson, C.S., *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy : principles and applications*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1999. **34**: p. 203-256.
169. Gibbs, S.J. and C.S. Johnson, *a pgf nmr experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents*. journal of magnetic resonance, 1991. **93**(2): p. 395-402.
170. Stejskal, E.O. and J.E. Tanner, *spin diffusion measurements - spin echoes in presence of a time-dependant field gradient*. journal of chemical physics, 1965. **42**(1): p. 288.
171. Forsén, S. and R.A. Hoffman, *study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonnance*. journal of chemical physics, 1963. **39**: p. 2892-2901.
172. Mayer, M. and B. Meyer, *group epitope mapping by saturation transfer difference nmr to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(25): p. 6108-6117.
173. Mayer, M. and B. Meyer, *characterisation of ligand binding by saturation transfer difference nmr spectroscopy*. angewandte Chemie - intenationnal edition, 1999. **38**(12): p. 1784-1788.

174. Herfurth, I., T. Weimar, and E. al., *application of 3d-tocsy-trnoesy for the assignment of bioactive ligands from mixtures this work was supported from the bmbf (fkz 031161) and from the German Research Council (DFG, Sonderforschungsbereich 470, Teilprojekt B3). We thank the Fonds der Chemischen Industrie for generous support. We also thank Dr. T. Keller and Dr. G. Wolff (Bruker Analytik GmbH, Germany) for excellent support. Dr. Yasmin Karimi-Nejad (Solvay Pharmaceuticals, Netherlands) is thanked for helpful discussions.* *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000. **39**(12): p. 2097-2999.
175. Viegas, A., et al., *Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding.* *Journal of Chemical Education*, 2011. **88**(7): p. 990-994.
176. Andrew, E.R. and R.A. Newing, *The Narrowing of Nuclear Magnetic Resonance Spectra by Molecular Rotation in Solids.* *Proceedings of the Physical Society*, 1958. **72**(6): p. 959.
177. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions.* *J. Biomol. NMR* 2, 1992. **2**: p. 661-666.
178. Davies, D.B., L.N. Djimant, and A.N. Veselkovb, *<sup>1</sup>H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis.* *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 1996(92): p. 383-390.
179. Mouret, L., G. Da Costa, and A. Bondon, *Sterols associated with small unilamellar vesicles (SUVs): intrinsic mobility role for <sup>1</sup>H NMR detection.* *Magnetic Resonance in Chemistry : MRC*, 2014. **52**(7): p. 339-44.
180. Watrelot, A.A., et al., *Neutral sugar side chains of pectins limit interactions with procyanidins.* *Carbohydrate Polymers*, 2014. **99**: p. 527-536.
181. Gawel, R., *Red wine astringency : a review.* *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1998. **4**: p. 74-95.
182. Weinges, K., et al., *Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, X Procyanidine aus Früchten.* *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1968. **711**(1): p. 184-204.